

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
HORMONELLE REGULATION
DES TAG- UND NACHTRHYTHMUS
DER 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-
COENZYM-A-REDUKTASE-AKTIVITÄT**

Hans Joachim Huber

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über die hormonelle Regulation des Tag- und Nacht-
rhythmus der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Akti-
vität.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilian-Universität
München

vorgelegt
von
Hans Joachim Huber
aus Grassau
München 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. D. v. Holst

Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.1974

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1969 bis Februar 1974 unter Anleitung von Herrn Dr. B. Hamprecht am Biochemischen Institut der Universität München, dem Max-Planck-Institut für Zellchemie und späterem Max-Planck-Institut für Biochemie (Leitung Prof. Dr. F. Lynen) ausgeführt.

Herrn Dr. B. Hamprecht bin ich für die vorzügliche Anleitung zu dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Herrn Prof. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir zukommen ließ.

Frau S. Latzin danke ich für die zuverlässige und konzentrierte Mitarbeit seit Juni 1971, sowie Herrn H. Ganser für seine fleißige Mithilfe während der letzten drei Monate meiner Versuche.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. W. Guder und Frä. B. Stukowski für die Adrenalektomie, Herrn Dr. O.A. Müller für die Bestimmung des Plasmacorticosterons, Herrn Dr. P. Scriba für die wertvollen Diskussionen, Herrn Dr. B. Brauser und Frä. O. Langguth für die Ganglionektomie, Herrn Dr. V.P. Gabel für die Augenenuklation, sowie Herrn E. v. Stetten für die Überlassung von 3-Methyl-glutaconyl-CoA-Hydratase aus *Achromobacter* IV S und Herrn Dr. U. Schiele für die 3-Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* IV S.

Der Universität München danke ich für ein Stipendium und dem Sonderforschungsbereich 51 der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle und materielle Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit.

Meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Verfahren zur Bestimmung der Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Reduktase-Aktivität	8
1. Vorbemerkung	8
2. Allgemeine Beschreibung des Verfahrens	8
3. Leerwert- und Ausbeutekorrektur	9
4. Berechnung der spezifischen Aktivität der HMG-CoA-Reduktase	9
5. Beziehung zwischen der Konzentration mikrosomalen Proteins und der Aktivität der HMG-CoA-reduktase	10
III. Untersuchungen über die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase der Rattenleber	12
1. Bedeutung des Hell-Dunkelwechsels für den tageszeitlichen Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität	12
a) Veränderungen nach Umkehr des Beleuchtungsrhythmus	12
b) Einfluß von Dauerlicht und Dauerdunkel	19
c) Diskussion	23
2. Bedeutung von Hormonen für die Regulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität	24
a) Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase in ganglionektomierten Ratten	24
b) Einfluß der Hypophysektomie	26
c) Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase in adrenalectomierten Ratten	30
d) Versuche zur Restauration hoher Reduktase-Aktivitäten von hypophysektomierten Ratten	35
e) Wirkung von Insulin auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase normaler, diabetischer und hypophysektomierter Ratten	41
f) Trijodthyronin, Insulin und HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Alloxan-diabetischen Ratten	45
3. Versuche zur Interkonvertierbarkeit der HMG-CoA-Reduktase	47

IV. Untersuchungen über Aktivität der HMG-CoA-Reduktase von Hepatomazellen	49
1. HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Hepatomazellen	49
2. Einfluß von Insulin	50
V. Zusammenfassende Diskussion	53
VI. Experimenteller Teil	59
1. Geräte	59
2. Substanzen	61
3. [5- ¹⁴ C]HMG-CoA-Lösung	62
4. Proteinbestimmung	64
5. Ratten, Käfige und Standarddiät	64
6. Statistik	64
7. Zu Kapitel II (Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität)	65
a) Inkubation	65
b) Extraktion von Mevalonolacton	66
c) Chromatographie	67
d) Trennungseigenschaften des Anionenaustauschers in Abhängigkeit von der Füllhöhe	67
e) Enzym-Simulationsversuch	69
f) Angaben zu einzelnen Versuchen	70
8. Zu Kapitel III (Untersuchungen über die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase der Rattenleber)	71
a) Tierhaltung	71
b) Umkehrung des Beleuchtungsrhythmus	71
c) Dauerlicht und Dauerdunkel	71
d) Ektomie der superioren Cervicalganglien	72
e) Hypophysektomie	72
f) Adrenalektomie	72
g) Alloxan-Diabetes	73
h) Angaben zu einzelnen Versuchen	73
9. Zu Kapitel IV (Untersuchungen über die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Hepatomazellen)	74
a) Herkunft der Zell-Linie	74
b) Lösungen für die Zellkultur	74

	Seite
c) Subkultivierung der Zellen	76
d) Einfrieren der Zellen	76
e) Ernte der Zellen für die Aktivitätsbestimmung der HMG-CoA-Reduktase	76
f) Angaben zu Fig. 23, S. 51	77
VII. Zusammenfassung	78
VIII. Literaturverzeichnis	80
Lebenslauf	86

Abkürzungsverzeichnis:

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CoA	Coenzym A
cyclo-AMP	cyclisches-3',5'-Adenosinmonophosphat
cyclo-GMP	cyclisches-3',5'-Guanosinmonophosphat
D	Dunkel
DD	Dauerdunkel
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dpm	Desintegrationen pro min
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum ("fetal calf serum")
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl, 3-Hydroxy-3-methylglutarat, 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure
HMG-CoA-Reduktase	Mevalonat: NADP Oxidoreduktase (CoA acylierend) (E.C.1.1.1.34)
Ipm	Impulse pro min
L	Licht
LL	Dauerlicht
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MVA	Mevalonat
MVL	Mevalonolacton
NADP ⁺	Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, oxidiert
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
RNS	Ribonucleinsäure
SCP	Sterol Carrier Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	thyroidstimulierendes Hormon
ZT	Zimmertemperatur

I. EINLEITUNG

Die Aufklärung des biologischen Synthesewegs des Cholesterols im Säugetierorganismus in den Laboratorien von Lynen (1), Bloch (2), Popják und Cornforth (3) und Folders (4) schuf die Voraussetzung für die Erforschung der Regulation dieser Synthese. Der Einfluß äußerer Faktoren auf die hepatische Cholesterolsynthese wurde im Tierexperiment erst an Kaninchen und Hunden, dann auch an Ratten untersucht: Cholesterolfütterung (5,6), Fasten (7,8) und Gallensäurefütterung (9,10) bewirkten eine deutliche Senkung der Geschwindigkeit der Synthese des Cholesterols aus Acetat. Entfernung der Gallensäuren aus dem enterohepatischen Kreislauf durch Verfüttern einer Diät mit hohem Rohfasergehalt (11), Gaben des Anionenaustauschers Cholestyramin (12) oder Drainage des Gallengangs (13) ließ den Acetateinbau in Lebercholesterol stark ansteigen. Ebenfalls erhöht war die Cholesterolsynthese in der Leber, wenn durch Anlegen einer Lymphfistel verhindert wurde, daß intestinal resorbiertes Cholesterol zur Leber gelangte (14). Eine erhebliche Stimulierung des Acetateinbaus in Cholesterol erreichte man durch intravenöse Injektion des nichtionogenen Detergens Triton WR 1339 (15).

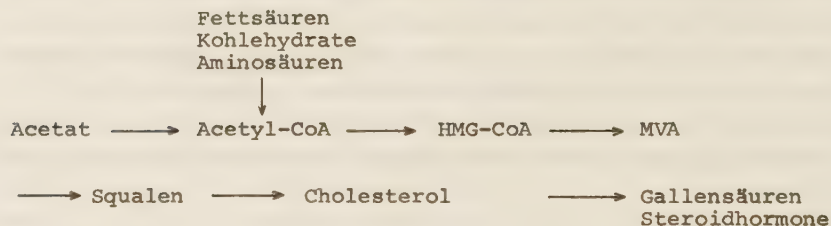
Die Beteiligung von Hormonen an der Regulation des Acetateinbaus in Lebercholesterol wurde in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen. Tomkins et al. zeigten, daß Leberschnitte von hypophysekтомierten Ratten nur mehr in geringem Maße ^{14}C -Acetat in Cholesterol inkorporierten (16), jedoch die Fähigkeit zur normalen Cholesterolsynthese wieder zurückerlangten, wenn den Ratten zusätzlich Wachstumshormon eingespritzt wurde (17). Perry und Bowen (18) berichteten, daß der Acetateinbau in Cholesterol bei Leberschnitten adrenaletomierter Ratten nur halb so groß war wie bei Schnitten aus normalen Tieren. Lediglich 10-20 % der Höhe der Kontrollwerte erreichte der Einbau radioaktiven Acetats in vivo in das Lebercholesterol adrenaletomierter Tiere (19). Eine beträchtliche Steigerung der Cholesterolbildung aus Acetat in der Leber erzielte man durch Zufuhr von Thyroidhormonen (17, 20, 21).

Verschiedene Autoren erhielten Hinweise für eine Beteiligung des Insulins an der Regulation der Cholesterogenese: Pankreatektomie (22) und Alloxan-Diabetes (22,23; 24 und dort zitierte Literatur) verminderten die hepatische Cholesterolsynthese bis zu 95 % (22).

Portalvenöse Insulininjektion erhöhte den Acetateinbau in Lebercholesterol alloxandiabetischer Ratten um das mehrfache der Kontrollwerte (25).

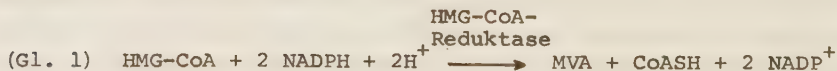
Berthet (26) fand eine 50 % Hemmung der Cholesterolsynthese aus Acetat bei Kaninchenleberschnitten, die mit Glukagon oder Adrenalin inkubiert wurden. In Gegenwart von cyclo-AMP oder seinem Dibutyrylderivat sank der Acetateinbau in Cholesterol bei Leberschnitten um 80 % und mehr (27).

Den entscheidenden Beitrag für das Verständnis der Regulation der Cholesterogenese lieferten Bucher, Overath und Lynen (28): Unter den vielen Einzelschritten der langen Synthesekette (das Schema der Fig. 1 zeigt nur einige wichtige Zwischenstufen)



- Fig. 1 -

erkannten sie die Reduktion von HMG-CoA zu MVA (Gl.1):



als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Die Reaktion wird katalysiert von dem Enzym HMG-CoA-Reduktase (E.C.1.1.1.34), das an die Membranen der Mikrosomen eines Leberhomogenats gebunden ist. Bucher, Overath und Lynen (28) konnten zeigen, daß die Geschwindigkeit des Acetateinbaus in Cholesterol in der Leber hungernder Ratten deswegen auf sehr niedrige Werte abgesunken war, weil die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase nahezu verschwunden war. Damit lag die Vermutung nahe, daß auch andere regulierende Einflüsse

auf die Cholesterolsynthese durch Veränderung der Aktivität dieses Enzyms zur Geltung kämen.

An Versuchen, die die regulierende Stellung der HMG-CoA-Reduktase aufzeigten, hat es nicht gefehlt. Die Senkung der Synthesegeschwindigkeit des Lebercholesterols aus Acetat nach Cholesterolfütterung ist, wie Sipersteins Gruppe zeigte (29), auf einen Aktivitätsschwund der HMG-CoA-Reduktase zurückzuführen. Hamprecht et al. (30) fanden die durch frühere Untersuchungen (31) bereits sehr wahrscheinlich gemachte hemmende Wirkung diätetischer Gallensäuren auf dieses Enzym. Van Bruggen (22) gelang es, den senkenden Einfluß des Alloxandiabetes auf Schritte vor Mevalonat einzuschränken. Guder (32, 33) konnte eine Abhängigkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität vom Thyroidhormonspiegel nachweisen. Die Stimulation der Cholesterolsynthese durch Triton erwies sich als die Folge einer Steigerung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (28). Im Münchner Laboratorium konnte 1969 gezeigt werden, daß die Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese aus Acetat in der Rattenleber systematischen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt (31) und die HMG-CoA-Reduktase einer ähnlichen Rhythmik folgt (34). Dies wurde in der Folgezeit mehrfach durch andere Autoren bestätigt (35-37, 41). Die spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase erreicht in der Dunkelperiode (19^h - 7^h MEZ) um 2^h ihr Maximum. Die Hellperiode (7^h - 19^h) ist durch ein niedriges Plateau mit einem Minimum um 14^h gekennzeichnet. Die Aktivität um 2^h ist ca. 13 mal größer als die um 14^h (34).

Ähnliche rhythmische Schwankungen von Enzymaktivitäten als Funktion der Tageszeit sind seit längerer Zeit bekannt. So wurde in der Rattenleber für die Tyrosintransaminase (38), Tryptophanpyrrolase (39) und in der Mäuseleber für die HMG-CoA-Reduktase (40) eine tageszeitliche Phasenbeziehung entdeckt.

Siperstein et al. (42) stellten auf Grund der In-vivo-Hemmbarkeit der Cholesterolsynthese durch eine cholesterolreiche Lipoproteinfraktion die Hypothese auf, die HMG-CoA-Reduktase sei ein allosterisches Enzym und ein cholesterolhaltiges Lipoprotein wirke als dessen "Feedback"-Inhibitor. Jedoch eine Reihe von Befunden sprachen gegen einen Rückkopplungs-Mechanismus. Weder Cholesterolsuspensionen (43, 44) noch cholesterolhaltige Lipoproteinfraktionen (45) vermochten in vitro die HMG-CoA-Reduktase zu hemmen; auch

scheiterten bislang alle Versuche, das aus Lebern cholesterolgefütterter Ratten isolierte Enzym durch Entfernung eines lipidartigen oder wasserlöslichen Inhibitors zu reaktivieren (43, 45). Als Alternative bot sich die Vorstellung an, daß Cholesterol die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase durch Veränderung der Auf- und/oder Abbaugeschwindigkeit der Enzymmolekel reguliert. Erst die Solubilisierung und Anreicherung des Enzyms (44, 46, 47) und die Entwicklung eines Immunchemischen Verfahrens zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Konzentration (48) ermöglichte eine exakte experimentelle Prüfung dieser Hypothese. Die in diesem Zusammenhang von Higgins et al. (48) durchgeführte Untersuchung brachte ein überraschendes Ergebnis: Durch Cholesterolfütterung sank die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase viel rascher ab, als die immunochemisch nachweisbare Enzymmenge (48). Offenbar kommt als Wirkbereich des Cholesterols auf die Regulation seiner Synthese sowohl das Enzymniveau als auch das Niveau der Proteinsynthese in Frage. Brown et al. (49) konnten für die niedrige Reduktase-Aktivität bei Fibroblastenkulturen einen Lipoproteinfaktor ($\eta < 1.21\text{g/cm}^3$) aus dem zur Kultur verwendeten Kälberserum verantwortlich machen. Entzogen sie den Kulturen die aktive Komponente durch Weglassen des Serums, stieg die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase auf das 10-fache ihres ursprünglichen Wertes an. Dieser Anstieg bedarf anscheinend der Proteinsynthese und der RNS-Synthese, da er in Gegenwart von Cycloheximid oder Actinomycin D unterblieb. Neuere Untersuchungen zeigten, daß das Cytosol der Leber ein Squalen- und Sterol-Carrier-Protein enthält, das während der Cholesterolbiosynthese als Vehikel für die wasserunlöslichen Vorläufer dient und wahrscheinlich auch am Transport und Metabolismus des Cholesterols teilnimmt (50-53). Welche Bedeutung dem Sterol-Carrier-Protein bei der Regulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität zukommt, ist unbekannt. In diesem Zusammenhang interessant erscheint die Tatsache, daß ein dem Sterol-Carrier-Protein strukturell ähnliches Protein Bestandteil einer Lipoproteinfraktion des Serums ist (50, 51).

Figmoari und Rodwell fanden, daß Gallensäuren die Mevalonatbildung aus Acetat in zellfreien Leberextrakten hemmen (54). Ihre daraus hergeleitete Hypothese, daß Gallensäuren die "Feedback"-Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase seien, ließ sich nicht länger

aufrechterhalten, als Hamprecht et al. (30, 55) zeigten, daß physiologische Konzentrationen von Gallensäuren (31) in vitro dieses Enzym nicht hemmen. In einer anderen Studie konnten Hamprecht et al. (56) zeigen, daß der Hemmeffekt der Gallensäuren auf die HMG-CoA-Reduktase Aktivität direkt in der Leber zustandekommt und nicht indirekt über eine verbesserte Resorption intestinalen Cholesterols, das dann selbst eine Senkung der Enzymaktivität bewirken würde. Die Autoren vermuteten, daß Gallensäuren den Auf- und/oder Abbau der HMG-CoA-Reduktase beeinflussen.

Back, Hamprecht und Lynen (31) nahmen an, daß der Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase in Analogie zu den 24 h - Rhythmen anderer Leberenzyme (38, 39), durch Veränderung der Neusynthese von Enzymprotein bedingt sei. Erste Hinweise in diese Richtung brachte die Hemmbarkeit des rhythmischen Aktivitätsanstiegs der hepatischen Cholesterolsynthese (31) und der HMG-CoA-Reduktase (35, 40, 57, 58) durch Inhibitoren der Proteinsynthese. Schließlich bewiesen Higgins et al. (59) mit ³H-Leucin-Einbaustudien in hochgereinigte HMG-CoA-Reduktase, daß der Rhythmus der Enzymaktivität das Resultat oszillierender Enzymsynthese ist. Verschiedene Autoren ermittelten aus dem rhythmischen Aktivitätsabfall der HMG-CoA-Reduktase Halblebenszeiten des Enzyms von 2-4 h (35, 36, 40, 59).

Als Ursache eines Enzymrhythmus in der Leber kommen theoretisch alle periodischen Faktoren außerhalb des Organismus, innerhalb des Organismus und innerhalb der Leberzelle selbst in Betracht. Der Verlauf der Aktivitätskurve der HMG-CoA-Reduktase ähnelt dem Rhythmus der körperlichen Aktivität und dem der Futteraufnahme (30) der dunkelaktiven Ratte. Zyklische Futteraufnahme scheidet jedoch als möglicher Regulator der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aus, da der Enzymrhythmus selbst in 24 h lang gehungerten Ratten persistiert (wenn auch mit stark verminderter Amplitude) (34). Dies deutet daraufhin, daß andere periodische Signale als Futteraufnahme Ursache des Rhythmus sein müssen.

Ein Rhythmus, der durch den Hell-Dunkel-Wechsel erzeugt wird, unterscheidet sich von einem Rhythmus endogenen Ursprungs durch sein Verhalten im Dauerdunkel oder Dauerlicht. Ersterer wird bei Abwesenheit des Hell-Dunkel-Wechsels ausgelöscht, während letzterer

weiterbesteht. Die Beseitigung des 24 h - Rhythmus der epiphysealen Serotonin-N-Acetyltransferase in im Dauerlicht gehaltenen Ratten demonstriert, daß der Hell-Dunkel-Wechsel eine Ursache dieses Enzymrhythmus ist (60). Die Aufrechterhaltung des Rhythmus der hepatischen Tyrosintransaminase in Ratten, die im Dauerdunkel oder im Dauerlicht gehalten wurden, zeigt, daß dieser Rhythmus nicht durch den Hell-Dunkel-Wechsel erzeugt wird und wahrscheinlich endogen gesteuert wird (61). Endogene Rhythmen können jedoch durch den Hell-Dunkel-Wechsel synchronisiert werden, d. h. der Hell-Dunkel-Wechsel bestimmt die Phase eines solchen Rhythmus, er ist Zeitgeber eines Rhythmus (62). Die Tatsache, daß der Hell-Dunkel-Wechsel als Zeitgeber für einen 24 h-Rhythmus fungiert (62), läßt sich daran erkennen, daß bei Änderung des Hell-Dunkel-Phasenwinkels gegenüber der Tageszeit der beobachtete Rhythmus dieser Verschiebung folgt (40, 63-65). So konnte der Tagesrhythmus der hepatischen Tyrosintransaminase durch Verschiebung der Hell-Dunkel-Phase um 12 h umgekehrt werden (61, 66).

Ein Ziel vorliegender Arbeit war, die Bedeutung des Hell-Dunkel-Wechsels für die Regulation des Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität aufzuklären. Insbesondere galt es die Frage zu beantworten:

Ist der Hell-Dunkel-Wechsel Zeitgeber für den HMG-CoA-Reduktase-Rhythmus? Sollte dies der Fall sein, wäre die nächste Frage, ob der Rhythmus endogen erzeugt wird, oder ob der Hell-Dunkel-Wechsel selbst Ursache des Rhythmus ist.

Es sollte ferner untersucht werden, ob die beschriebenen hormonellen Einflüsse auf die hepatische Cholesterogenese durch eine Veränderung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität hervorgerufen werden. Es wird deshalb berichtet über:

- 1) Untersuchungen über den Einfluß der Epiphyse, der Hypophyse und der Nebennieren auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in der Rattenleber.
- 2) Untersuchungen über die Wirkung von Trijodthyronin, Wachstumshormon, Insulin und Glucagon auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.
- 3) Versuche zur Interkonvertierbarkeit der HMG-CoA-Reduktase.
- 4) Untersuchungen über den Einfluß von Insulin auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase von Hepatomazellen.

Das für einen Teil dieser Untersuchungen verwendete radiogaschromatographische Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität war zeitraubend und wurde deshalb durch ein schnelleres Verfahren abgelöst, von dem zuerst die Rede sein soll.

II. VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER HMG-CoA-REDUKTASE AKTIVITÄT (123)

1. Vorbemerkung

Die HMG-CoA-Reduktase ist Bestandteil der mikrosomalen Fraktion eines Rattenleberhomogenats (15). Während für die Aktivitätsbestimmung des löslichen Enzyms aus Hefe ein photometrischer Test verwendet werden kann (67), bedient man sich beim membrangebundenen Enzym eines radiochemischen Tests. Das allen zur Zeit benutzten radiochemischen Verfahren gemeinsame Problem ist die Trennung des radioaktiv markierten Substrats HMG-CoA (oder des daraus entstandenen Hydroxymethylglutarat) vom Reaktionsprodukt Mevalonat (oder dem daraus hergestellten Mevalonolacton). Die Trennung des Substrats vom Produkt wird erreicht durch

- 1) enzymatische Phosphorylierung des Mevalonats mit anschließender Ätherextraktion des Hydroxymethylglutarats (28, 67).
- 2) Säulenchromatographie über Kieselgur (68).
- 3) Gaschromatographie (40, 69 - 72).
- 4) Dünnschichtchromatographie (59, 73- 75) oder Dünnschicht-elektrophorese (76, 77).

Diese in der Genauigkeit unterschiedlichen Verfahren sind recht zeitraubend. Es wurde deshalb das unten beschriebene Verfahren ausgearbeitet, das weniger Zeit benötigt, als die oben genannten Verfahren.

2. Allgemeine Beschreibung des Verfahrens.

[¹⁴C] HMG-CoA wird in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems mit Mikrosomen inkubiert. Am Ende der Inkubation werden bekannte Mengen [³H]MVA als radioaktiver Träger (s.u.) zugesetzt und die Reaktion durch Abkühlen und anschließendes Ansäuern beendet. Nach vollständiger Lactonisierung (55) wird Wasser durch Zusatz von Na₂SO₄ gebunden, mindestens eine Stunde stehengelassen und Mevalonolacton mit Äther extrahiert. Die Trennung des Lactons vom Hydroxymethylglutarat wird durch Säulenchromatographie über einen Anionenaustauscher erreicht. Hydroxymethyl[¹⁴C]glutarat wird vom Anionenaustauscher gebunden, während das ungeladene Mevalonolacton (³H- und ¹⁴C-markiert) die Säule passiert. Die ³H-

und ^{14}C -Radioaktivitäten (dpm) des Säuleneluats werden mit einem Szintillationszähler bestimmt. (Nähere Einzelheiten s. Exptl. Teil, S. 65).

3. Leerwert- und Ausbeutekorrektur.

Bei der Austauschchromatographie passiert ein kleiner Teil des ^{14}C HMG' zusammen mit ^3H - und ^{14}C MVL die Säule. Um den Anteil des ^{14}C HMG' im Säuleneluat festzustellen, wird eine Testmischung, die bei der Inkubation alle Ingredienzien außer Mikrosomen enthält, in der zuvor beschriebenen Weise verarbeitet. Der so ermittelte Leerwert ($R_{14\text{C-HMG}}$) ist von all jenen ^{14}C -Werten ($R_{14\text{C}}$) abziehen, die bei Inkubationen in Gegenwart von Mikrosomen erhalten werden. Man erhält dann die Radioaktivität, die von dem im Säuleneluat befindlichen ^{14}C MVL herrührt (Gl. 2):

$$(\text{Gl. 2}) \quad R_{14\text{C-MVL}} = R_{14\text{C}} - R_{14\text{C-HMG}}$$

Bei der Aufarbeitung (Ätherextraktion, Säulenchromatographie) geht von Probe zu Probe ein wechselnder Anteil (40-50%) an MVL verloren. Deshalb müssen die nach Subtraktion des Leerwerts erhaltenen ^{14}C -Werte (dpm) mit Hilfe der ^3H -Werte (dpm) der Probe auf Ausbeute korrigiert werden. Der nach Leerwert- und Ausbeutekorrektur erhaltene Wert für ^{14}C MVL ist ein Maß für die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase.

4. Berechnung der spezifischen Aktivität der HMG-CoA-Reduktase

Die Formel zur Berechnung der spezifischen Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, ausgedrückt in nMol gebildetes Mevalonat (MVA) pro mg mikrosomales Protein pro Stunde, ist in Gleichung 3 wiedergegeben:

$$(\text{Gl. 3}) \quad A = \frac{\frac{R_{3\text{H-MVA}}}{R_{3\text{H}}} (R_{14\text{C}} - R_{14\text{C-HMG}})}{S \cdot E \cdot v \cdot t}$$

Dabei bedeutet:

A [nMol·mg⁻¹·h⁻¹] : Spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase
(27.7)

R_{14C} [dpm]	: Radioaktivität des nach Säulenchromatographie gefundenen [^{14}C]HMG+[^{14}C]MVL (14500)
R_{3H} [dpm]	: Radioaktivität des nach Säulenchromatographie gefundenen [3H]MVL (34920).
R_{3H-MVA} [dpm]	: Radioaktivität des am Ende der Inkubation zugesetzten 3H -MVA (59985).
$R_{14C-HMG}$ [dpm]	: Radioaktivität des nach Säulenchromatographie gefundenen [^{14}C]HMG (173.5)
S [dpm $\cdot$ nMol $^{-1}$]	: Spezifische Radioaktivität des Substrats [$5-^{14}C$]HMG-CoA (4.76×10^4).
E [mg $\cdot$ ml $^{-1}$]	: Proteinkonzentration der im Test eingesetzten Mikrosomensuspension (3.75).
v [ml]	: Volumen der Mikrosomensuspension, das im Test eingesetzt wird (0.005).
t [h]	: Reaktionszeit (1.00)

In runden Klammern sind typische Werte angegeben.

5. Beziehung zwischen Konzentration mikrosomalen Proteins und Aktivität der HMG-CoA-Reduktase.

Um festzustellen, ob das neu entwickelte Verfahren und das anfänglich verwendete Verfahren (72) vergleichbare Ergebnisse liefern, wurden zur Bestimmung der Reduktase-Aktivität Inkubationen zweifach für jede Proteinkonzentration ausgeführt. Ein Satz der Proben wurde mit der radiogaschromatographischen Methode analysiert, der andere mit dem oben beschriebenen Anionenaustauscher-Verfahren. Fig. 2 zeigt, daß die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase gemessen mit dem neuen Verfahren (Kurve II) linear mit der eingesetzten Proteinmenge zunimmt:

Die auf diese Weise gefundenen Aktivitäten weichen um etwa 10 % von den Werten ab, die mit der gaschromatographischen Methode (Kurve I) erhalten wurden (Fig. 2). Obwohl beide Verfahren mit vergleichbarer Genauigkeit arbeiten, bringt das neue Verfahren drei wesentliche Vorteile:

Es ist schneller (Zeit, die für die chromatographische Analyse von 50 Proben benötigt wird: Gaschromatographie, 50 h; Anionenaus-

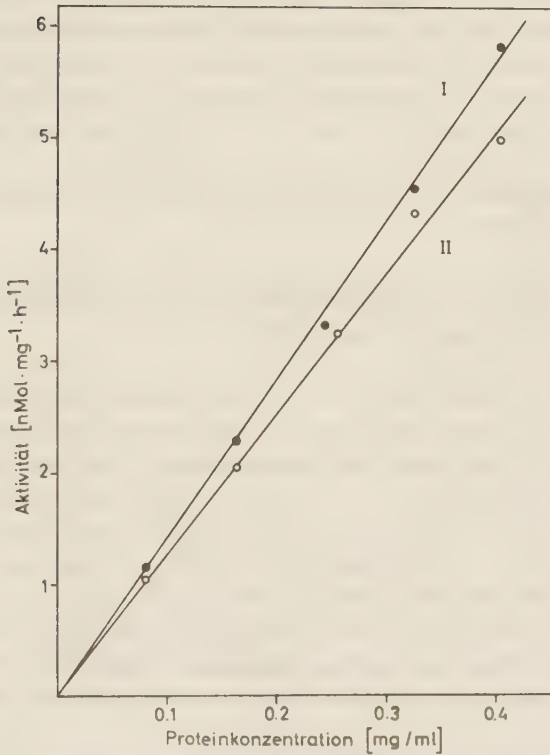


Fig. 2. Abhängigkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von der eingesetzten Enzymmenge.

Kurve I: radiogaschromatographische Analyse

Kurve II: Anionenaustauscher-Verfahren.

Siehe auch Text und Exptl. Teil, S. 70.

tauscher Chromatographie, 8 h), es ist einfacher und es ist empfindlicher als das radiogaschromatographische Verfahren. Die vergleichsweise hohe Empfindlichkeit rührt daher, daß bei der gaschromatographischen Methode das aus [^{14}C]MVL gebildete $^{14}\text{CO}_2$ nur ca. 0.2 Minuten in der Szintillationsdurchflußzelle bleibt. Bei Benützung der neuen Methode sind theoretisch die Zählzeiten nicht limitiert, da hier die Radioaktivität unter stationären Bedingun-

gen gezählt wird.

Das Prinzip eines erst kürzlich publizierten Verfahrens (78) zur Aktivitätsbestimmung der mikrosomalen HMG-CoA-Reduktase beruht auf der spektral-photometrischen Bestimmung des bei der HMG-CoA-Reduktase Reaktion freigesetzten Coenzym A. Dieses Verfahren ist wegen seiner hohen Empfindlichkeit als gleichwertig anzusehen.

III. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AKTIVITÄT DER HMG-CoA-REDUKTASE DER RATTENLEBER.

1. Bedeutung des Hell-Dunkelwechsels für den tageszeitlichen Rhythmus der Enzymaktivität (124).

Um die Frage zu beantworten, ob der Hell-Dunkel-Wechsel als Zeitgeber für den Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase wirkt, wurden Ratten zunächst unter einem normalen Beleuchtungszyklus gehalten. (Hellperiode während des Tages). Nach einem Phasensprung des Beleuchtungsrythmus von 12 h (d.h. die Hellperiode lag jetzt in der Nacht) wurden die Veränderungen der Futteraufnahme, der Körpergewichte und der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gemessen. Studien an Ratten, die im Dauerlicht oder Dauerdunkel gehalten wurden, sollten Aufschluß geben über die Frage, ob der Rhythmus endogen gesteuert wird oder ob der Licht-Dunkel-Wechsel selbst Ursache des Rhythmus ist.

a) Veränderungen nach Umkehr des Beleuchtungszyklus:

Futteraufnahme: Die Futteraufnahme der Ratten wurde im Zeitraum vor und nach dem Phasensprung bestimmt. Gemessen wurde jeweils um 7 h und 19 h, wobei die Meßwerte der Mitte des davorliegenden Zeitraumes von 12 h zugeordnet wurden (also 1 h bzw. 13 h). Ratten sind dunkelaktiv. Ihre Futteraufnahme ist somit in der Dunkelperiode erheblich höher als während einer Hellperiode. Im 12 h - Intervall der Dunkelperiode werden ca. 80 % des insgesamt in 24 h aufgenommenen Futters gefressen, die restlichen 20 % in der folgenden Hellperiode (30). Mißt man nun den Futterverbrauch immer zu den genannten Zeiten, jedoch nach dem Phasensprung des Beleuchtungsrythmus, so findet man eine Steigerung der Futteraufnahme in der neuen Dunkelperiode bzw. Absinken in der neuen Hellperiode (gegenüber Hell- bzw. Dunkelperioden vor dem Phasensprung). In Fig. 3 (unterer Teil ist der pro-

zentuale Anteil einer 12 h - Periode an der täglichen Futteraufnahme in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Es dauert mindestens 6 Tage, bis sich der Freßrhythmus der Tiere an den neuen Beleuchtungsrythmus angepaßt hat. Der erste Punkt von Kurve I

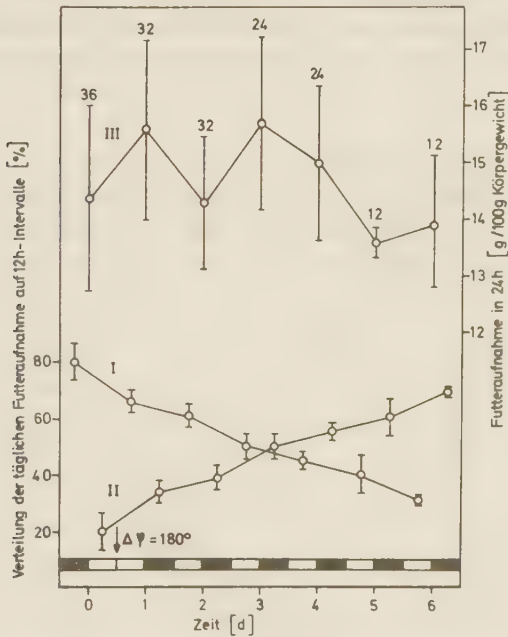


Fig. 3. Tägliche Futteraufnahme nach Phasensprung des Beleuchtungsrythmus ($\Delta \psi = 180^\circ$; L: 19^h - 7^h; D: 7^h - 19^h).

■ : Dunkelperiode, □ : Hellperiode.

Die Ratten wurden in Gruppen von 3 - 4 Tieren je Käfig gehalten. Die Futteraufnahme je Käfig wurde auf 100g Körpergewicht bezogen. Da pro Tagesmeßpunkt Meßwerte von mehreren Käfigen vorlagen, wurde bei jedem Mittelwert die Standardabweichung angegeben. Die Zahlen an den Punkten von Kurve III geben die Anzahl der untersuchten Ratten an. Kurven I und II: Verteilung der Futteraufnahme während 24h auf 12h-Intervalle; I: Futteraufnahme im Zeitraum 19^h - 7^h, II: Futteraufnahme im Zeitraum 7^h - 19^h, III: Gesamte Futteraufnahme während 24 h. Siehe auch Text u. Exptl. Teil, S. 71.

(Fig. 3) und der letzte Punkt von Kurve II sind signifikant ($p < 0.05$) verschieden, ebenso der erste Punkt von Kurve II und der letzte von Kurve I; d. h. nach 6 Tagen war möglicherweise die Resynchronisation der Futteraufnahme mit dem Beleuchtungsrythmus noch nicht vollständig (s. auch unten Resynchronisation des Rhythmus der Enzymaktivität). Die zugehörigen Absolutwerte der täglichen Futteraufnahme sind im oberen Teil von Fig. 3 wiedergegeben.

Gewichtszunahme: Die Resynchronisation des Freßrhythmus mit dem Hell-Dunkel-Rhythmus spiegelt sich auch in den Körpergewichten der Tiere wider. Die um 7^h bestimmten Gewichte von Tieren, die unter "normalem" Beleuchtungsrythmus gehalten wurden, sind infolge

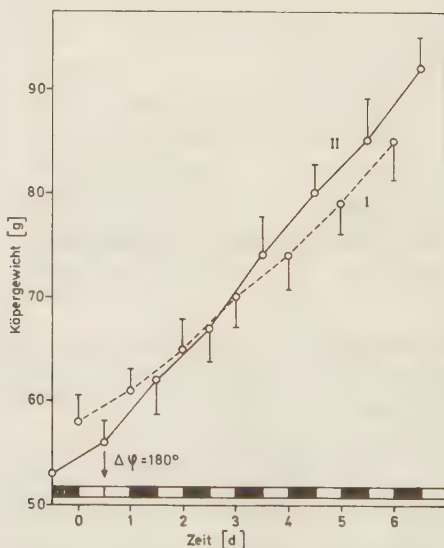


Fig. 4. Körpergewicht von Ratten nach Phasensprung des Beleuchtungsrythmus ($\Delta\psi = 180^\circ$, L: 19^h - 7^h; D: 7^h - 19^h). Jeder Wert ist der Mittelwert der Körpergewichte von 4 Ratten. Alle Meßwerte stammen von derselben Rattengruppe. Bei jedem Wert ist die Standardabweichung angegeben. Kurve I: Um 7^h gemessenes Körpergewicht, Kurve II: um 19^h gemessenes Körpergewicht.

großer Futteraufnahme während der vorausgehenden Dunkelperiode höher als die tags zuvor um 19^h gemessenen. Am 6. Tag nach dem Phasensprung hat sich das Verhältnis der um 7^h und 19^h gemessenen Körpergewichte umgekehrt (Fig. 4); d. h. 6 Tage nach dem Phasensprung hat die tageszeitliche Veränderung des Körpergewichts ihren gewohnten Phasenwinkel zum Zeitgeber wieder erreicht. Dabei wachsen die Tiere nach dem Phasensprung mit der normalen täglichen Gewichtszunahme (ca. 6 g/Tag) weiter (Fig. 5).

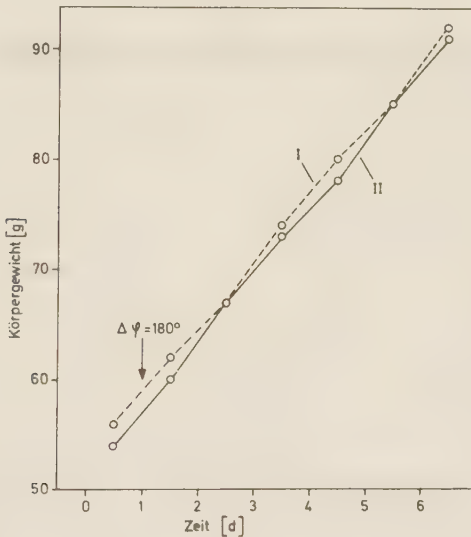


Fig. 5. Gewichtszunahme von Ratten während eines normalen und eines umgekehrten Beleuchtungsrythmus. Jeder Meßwert ist der Mittelwert der Körpergewichte von 4 Ratten. Die beiden Kurven wurden mit zwei verschiedenen Gruppen von Ratten gemessen, d. h. das Wesentliche dieser Kurven ist nicht die zufällige Koinzidenz der Absolutwerte, sondern die Gleichheit der Kurvensteigungen. Kurve I: Körpergewicht um 19^h nach Phasensprung ($\Delta \psi = 180^\circ$; L: $19^h - 7^h$, D: $7^h - 19^h$). Kurve II: Körpergewicht um 19^h bei normalem Beleuchtungsrythmus (L: $7^h - 19^h$; D: $19^h - 7^h$).

Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität: Dieselben Tiere, die zum Studium der Änderungen des Körpergewichts und der Futteraufnahme

nach dem Phasensprung verwendet wurden, dienten der Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität. Ratten wurden 1, 3, 5 und 7 Tage nach dem Phasensprung um 24^h und 12^h entsprechend den in der Nähe dieser Zeiten auftretenden Aktivitätsmaxima und -minima des Enzyms geschlachtet. Die Vergleichswerte wurden an zwei Gruppen von je 4 Tieren erhalten, die im gleichen Raum einem "normalen" Beleuchtungsrythmus ausgesetzt waren, jedoch einen Tag vor Phasensprung um 24^h bzw. 12^h geschlachtet wurden. Fig. 6 zeigt, wie sich die

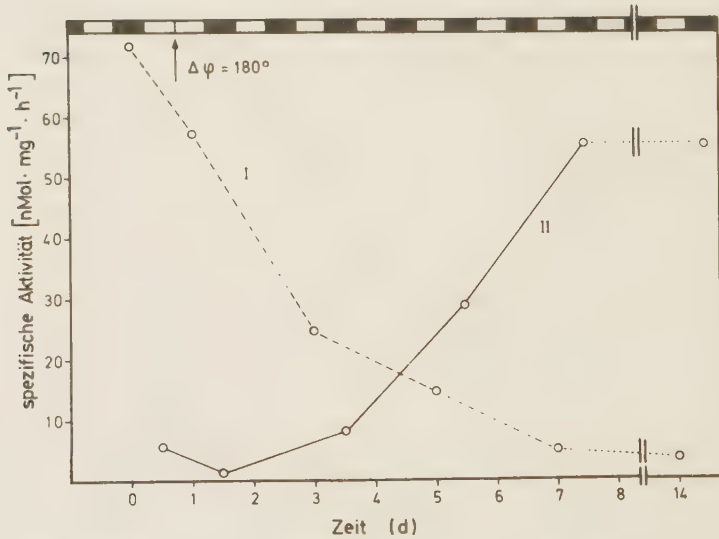


Fig. 6. Zeitlicher Verlauf der Phasenumkehr des Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase nach Phasensprung des Beleuchtungsrythmus ($\Delta \varphi = 180^\circ$; L: 19^h - 7^h; D: 7^h - 19^h).

Die Homogenate der Lebern einer Rattengruppe wurden vereinigt weiterverarbeitet und die erhaltene Mikrosomenfraktion auf HMG-CoA-Reduktase-Aktivität analysiert. ■ : Dunkelperiode, □ : Hellperiode. Kurve I: Messung um 24^h; Kurve II: Messung um 12^h.

die Enzymaktivitäten im Verlauf einer Woche entsprechend der Vertauschung von Hell- und Dunkelperiode verändert.

Das neue Maximum finden wir jetzt um 12^h das Minimum um 24^h. Diese Werte verändern sich während weiterer 7 Tage nicht mehr (Fig. 6). Der Unterschied zwischen maximalem Anfangswert (Kurve I) und maximalem Endwert (Kurve II) dürfte auf die große Streuung der Werte im Gipfelbereich der Rhythmuskurve (34) (s. auch Fig. 7, Kurve II) zurückzuführen sein. Es dauert also 7 Tage, bis der Rhythmus der Enzymaktivität wieder den ursprünglichen Phasenwinkel zum Hell-Dunkel-Rhythmus einnimmt.

Da hiermit die Umkehrbarkeit des Tag- und Nachtrhythmus des Enzyms (bei Umkehrung des Beleuchtungsrhythmus) erwiesen war, konnte in einem weiteren Versuch der Rhythmus resynchronisierter ("umgestellter") Ratten gemessen werden. Neun Gruppen zu je 4 Ratten wurden wie beschrieben "umgestellt" und 14 Tage nach dem Phasensprung zu bestimmten Tageszeiten geschlachtet. Die Werte der HMG-CoA-Reduktase-Aktivitäten dieser Tiere, als Funktion der Tageszeit aufgetragen (Fig. 7, Kurve I) ergeben ein Kurvenbild wie man es mit Ratten unter normalem Beleuchtungsrhythmus erhält (34) (Fig. 7, Kurve II). Erwartungsgemäß liegt das Maximum der spezifischen Aktivität nach Phasenumkehr nun bei 14^h, d. h. in der Mitte der neuen Dunkelperiode. Da der Versuch sich über einen Zeitraum von 2 Monaten erstreckte, wurde der 14^h Wert der Enzymaktivität zu Beginn und am Ende der Versuchsperiode an je einer Rattengruppe bestimmt. In Fig. 1, Kurve I, wurde der Mittelwert beider Messungen (55.0 bzw. $69.8 \text{ nMol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) verwendet. Die neue Hellperiode ist durch ein breites Plateau geringer spezifischer Aktivität mit einem Minimum um 2^h gekennzeichnet. Die Aktivität um 14^h beträgt das 19,6-fache der Aktivität um 2^h.

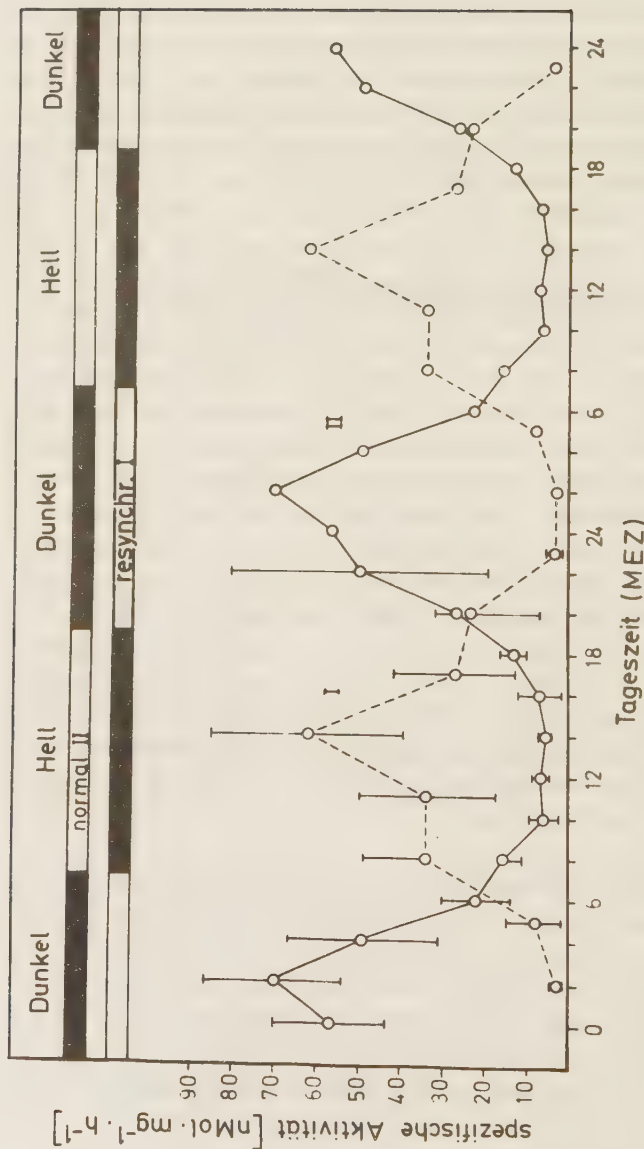


Fig. 7. Tageszeitlicher Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nach Phasenumkehr (Kurve I: L: 19^h - 7^h, D: 7^h - 19^h) und bei normalem Hell-Dunkel-Rhythmus (Kurve II, L: 7^h - 19^h, D: 19^h - 7^h). Alle Werte der Kurve I sind Mittelwerte aus Messungen an 4 Ratten (Ausnahmen: Messwert um 10^h: 3 Ratten und 14^h: 8 Ratten). Die Kurve II stammt aus Lit. (34) und wurde zum Vergleich eingezeichnet. Bei jedem Mittelwert ist die Standardabweichung angegeben. Der Übersichtlichkeit halber wurden beide Kurven über eine Periode von 48 h gezeichnet. Die Werte der Kurve I wurden 14 Tage nach dem Phasensprung ($\Delta\psi = 180^\circ$) des Beleuchtungsrythmus gemessen.

b. Einfluß von Dauerlicht und Dauerdunkel (125)

Da die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in hungernden Ratten stark verringert ist (28) wurde auch in diesen Experimenten die Futteraufnahme gemessen, um zu sichern, daß eine Verminderung der Enzymaktivität nicht durch einen gleichzeitig verursachten Fasteneffekt bedingt sein könnte. Wie erwartet, nahmen Ratten, die einem normalen Beleuchtungsrythmus ausgesetzt waren, periodisch während des Tages Futter auf. 79 % des Futters (17.3 g/120 g Körpergewicht/Tag) wurden dabei während der Dunkelperiode verzehrt. Während der 8 Tage dauernden Haltung im Dauerlicht blieb der tägliche Futterverbrauch unverändert (16.5 g/120 g Körpergewicht/Tag.) Am 8. Tag

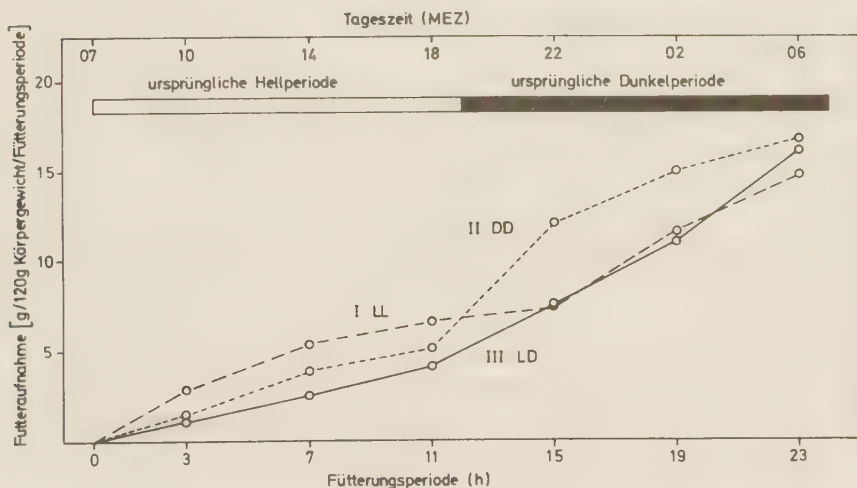


Fig. 8. Futteraufnahme von Ratten am 8. Tag Dauerlicht oder Dauerdunkel und Futteraufnahme von Ratten, die einem "normalen" Beleuchtungsrythmus ausgesetzt waren. Die Futteraufnahme wurde pro Käfig (4 Tiere pro Käfig) gemessen und pro Tier berechnet.

Kurve I: Futteraufnahme im Dauerlicht (LL);

Kurve II: Futteraufnahme im Dauerdunkel (DD);

Kurve III: Futteraufnahme unter "normalen" Beleuchtungsverhältnissen (LD) (34).

Dauerlicht wurden 58 % des Futters während der Dunkelperiode gefressen. Der Abfall von 79 % auf 58 % ist allmählich und wahrscheinlich durch die Desynchronisation der individuellen Rhythmen bedingt (79). Zu verschiedenen Zeiten des 9. Tages wurden Gruppen von Ratten getötet und die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität bestimmt. Bei denselben Tieren wurde die Futteraufnahme von 7^h bis zum jeweiligen Zeitpunkt des Tötens gemessen. Nach 9-tägiger Dauerlichtbehandlung fressen die Ratten noch periodisch (Fig. 8, Kurve I). Die totale Futteraufnahme am 9. Tag Dauerlicht (Fig. 8, Kurve I) ist vergleichbar mit der von Ratten die im Hell-Dunkel-Zyklus gehalten wurden (Fig. 8, Kurve III). Aus Fig. 9 (Kurve I) kann man entnehmen, daß der Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Tieren, die 9 Tage im Dauerlicht gehalten wurden, persistiert. Der Aktivitätsgipfel wird um 6^h erreicht, das Minimum zwischen 14 und 22^h.

In Fig. 9 wird zum Vergleich der unter "normalen" Beleuchtungsverhältnissen beobachtete Enzymrhythmus gezeigt (Kurve II). Während die Maximalaktivitäten beider Versuchsgruppen von vergleichbarer Größe sind, ist die minimale Enzymaktivität im Dauerlicht gehaltener Ratten bemerkenswert erhöht (vergleiche Kurven I und II, Fig. 9). Interessanterweise tritt der im Dauerlicht gefundene Aktivitätsgipfel zu einem späteren Zeitpunkt auf als bei der Kontrollgruppe.

Im Dauerdunkel gehaltene Ratten verzehrten periodisch reguläre Mengen Futter (17.3 g/120 g Körpergewicht/Tag) (Fig. 8, Kurve II). Wie im Dauerlicht, bleibt der Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität im Dauerdunkel erhalten (Fig. 10, Kurve I).

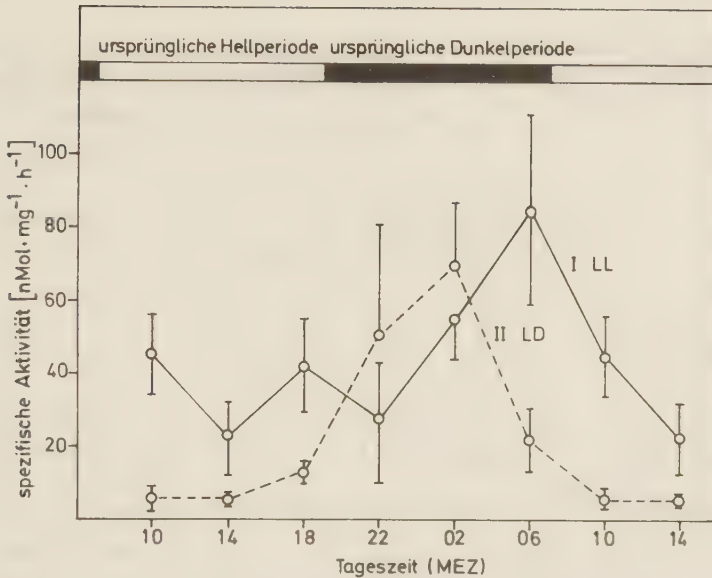


Fig. 9. Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase im Dauerlicht (Kurve I; LL) und unter einem "normalen" Hell-Dunkel-Zyklus (Kurve II; LD).

Die Werte von Kurve I wurden am 9. Tag Dauerlicht gemessen. Jeder Punkt von Kurve I und II ist das Mittel aus Werten von 4 Tieren. Kurve II ist zum Vergleich eingezeichnet (zitiert aus Lit. 34). Bei jedem Mittelwert ist die Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Um von dem rhythmischen Prozess einen besseren Eindruck zu vermitteln sind die Werte um 10^h und 14^h zweimal dargestellt. Die Werte um 6^h und 14^h (Kurve I) sind signifikant verschieden ($p < 0.01$).

Das Maximum der Enzymaktivität wird um 22^h gefunden, ihr Minimum zwischen 6^h und 10^h. Diese Kurve (Fig. 10, Kurve I) ähnelt stark der Kontrollkurve (Fig. 10, Kurve II), außer daß das Maximum in der Versuchsgruppe früher als in der Kontrollgruppe erreicht wird. Während der Zeit des Fütterns und Wiegens (7^h und 19^h) wurden die Tiere 15 Minuten dem Rotlicht, das zur Beleuchtung benutzt

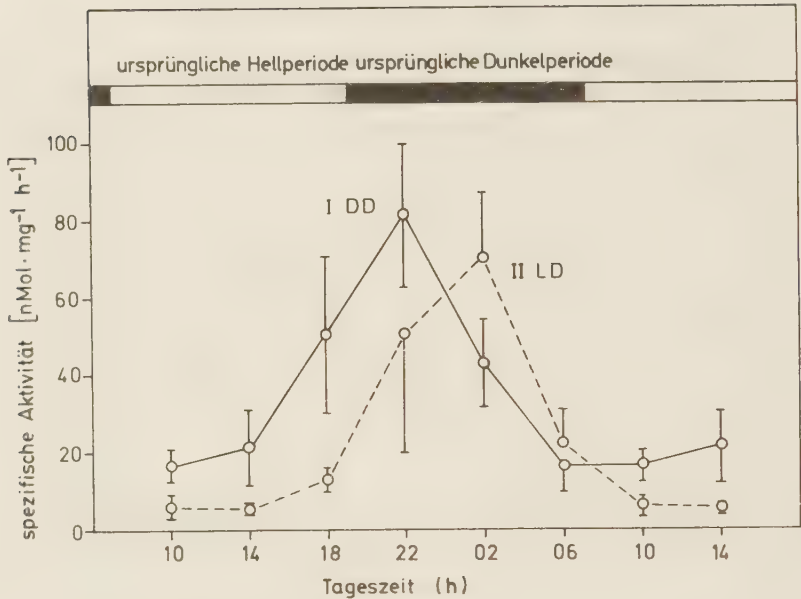


Fig. 10. Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität im Dauerdunkel (Kurve I; DD) und unter "normalem" Beleuchtungsrhythmus (Kurve II, LD). Weitere Details sind aus Fig. 9 zu entnehmen.

wurde, und dem Grünlicht der Waagenskala ausgesetzt. Um einen möglichen Einfluß dieser Lichtsignale zu eliminieren, wurden Experimente mit geblendeten Ratten (S. 71) unternommen, die im Dauerdunkel gehalten wurden. Hierzu wurden Gruppen von geblendeten und unbehandelten Ratten nach 9-tägiger Dauerdunkelbehandlung um 10^h und 22^h getötet. Sowohl um 22^h als auch um 10^h waren die HMG-CoA-Reduktase-Aktivitäten der geblendeten und unbehandelten Ratten einander gleich. Die Werte um 22^h waren signifikant höher ($p < 0.01$) als die um 10^h (Tabelle 1).

Tabelle 1

Spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase ($\pm$ Standardabweichung vom Mittelwert) von geblendeten oder unbehandelten Ratten nach 9 tägiger Haltung im Dauerdunkel.

Behandlung	Spezifische Aktivität [nMol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹]	
	10 ^h	22 ^h
Gebundet + DD	8.0 ($\pm$ 2.5)	36.5 ($\pm$ 22.5)
Unbehandelt + DD	10.0 ($\pm$ 4.3)	46.2 ($\pm$ 17.9)

Die Werte sind das Mittel aus Messungen an 4-5 Ratten. Die Kontrolltiere fraßen normale Mengen Futter (16.2 g/120 g Körpergewicht/24 h) während geblendete 21 % mehr verzehrten.

Weitere Einzelheiten siehe Exptl. Teil S. 71.

Dies bestätigt, daß der Rhythmus in Abwesenheit von Lichtreizen bestehen bleibt. Der Unterschied zwischen den Kontrollwerten, die um 22^h erhalten wurden und den Werten, die 6 Monate später (ebenfalls 22^h) unter vergleichbaren Bedingungen (Fig. 10, Kurve I) erhalten wurden, könnte durch saisonale Änderungen der Amplitude des Rhythmus bedingt sein. Dies wurde nicht weiter untersucht.

c) Diskussion.

Die Umkehrbarkeit des tageszeitlichen Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase bestätigt die vielfach beschriebene Zeitgeberwirkung des Hell-Dunkel-Wechsels (62). Der Enzymrhythmus wird nämlich auch dann synchronisiert, wenn die Phase des Hell-Dunkel-Rhythmus um 12 h verschoben ist. Das Fortbestehen des HMG-CoA-Reduktase-Rhythmus im Dauerlicht und im Dauerdunkel zeigt, daß es zur Aufrechterhaltung des Rhythmus nicht des Hell-Dunkel-Wechsels bedarf. Der Hell-Dunkel-Wechsel ist nicht Ursache, sondern lediglich Zeitgeber des Enzymrhythmus. Damit scheiden auch all jene mögli-

chen äußeren Faktoren als Zeitgeber und als Ursache für den Enzymrhythmus aus, die mit dem natürlichen Beleuchtungs-Zyklus synchronisiert sind. Wir schließen daraus, daß cyclische Signale endogenen Ursprungs für die Regulation des Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase verantwortlich sein müssen. Die Aufrechterhaltung des Enzymrhythmus in gefasteten Ratten (34, 36) zeigt, daß Futteraufnahme den Rhythmus nicht erzeugt. Jedoch kann die cyclische Verfügbarkeit von Futter als ein Zeitgeber des Rhythmus fungieren (36), der über die Zeitgeberwirkung des Hell-Dunkel-Wechsels dominiert (62).

2. Bedeutung von Hormonen für die Regulation der HMG-CoA-Reduktase Aktivität.

Bedingt durch die periodische Produktions- oder Absonderungsrates der Hormondrüsen unterliegen die Spiegel vieler Hormone im Blut der Ratte tageszeitlichen Schwankungen (80-83 und dort zitierte Literatur). Damit ist auch die Leber einer Fülle von zyklischen Hormonsignalen ausgesetzt, die (nach der im vorigen Abschnitt getroffenen Schlußfolgerung) als mögliche Auslöser des Rhythmus der hepatischen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Betracht kommen.

a) Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in ganglionektomierten Ratten (125).

Der Gehalt von Serotonin und Melatonin in der Epiphyse (Zirbeldrüse) variiert periodisch mit dem Hell-Dunkelwechsel (80,81). In der Epiphyse adulter Ratten hängen diese Rhythmen von der Unversehrtheit der Innervation dieses Organs durch sympathische Nervenfasern ab, die aus den oberen Cervicalganglien stammen (84). Der Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität befindet sich in Phase mit dem Melatoninrhythmus und in inverser Phase zum Serotoninrhythmus der Epiphyse. Wir untersuchten deshalb die Möglichkeit einer epiphysealen Regulation des Enzymrhythmus an Ratten, denen die beiden oberen Cervicalganglien entfernt worden waren (Exptl. Teil, S. 72). Ganglionektomierte, scheinoperierte und unbehandelte Ratten wurden 14 Tage lang unter einem "normalen" Hell-Dunkel-Wechsel gehalten. 1 bis 2 Tage vor dem Schlachten war die Gewichtszunahme ganglionektomierter Ratten von 6.lg/Tag (Körpergewicht ca. 170 g) vergleichbar mit der scheinoperierter oder

unbehandelter Tiere (5.9 g/Tag). Zu diesem Zeitpunkt war die tägliche Futteraufnahme der ganglionektomierten Ratten (12.1 g/120 g Körpergewicht) nur 10 % niedriger als die scheinoperierten (13.3 g/120 g Körpergewicht) und unbehandelter Tiere (13.5g/120 g Körpergewicht; alle Werte sind Mittelwerte von 4 Tieren). Am 14. Tag wurden die Tiere jeder Gruppe (45 Tage alt) um 12^h und 24^h getötet. Wie Tabelle 2 zeigt, beeinflußt Ganglionektomie den Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nicht.

Tabelle 2

Spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in ganglionektomierten, scheinoperierten und unbehandelten Ratten, die in einem "normalen" Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten wurden.

Behandlung	Spezifische Aktivität [nMol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹]	
	12 ^h	24 ^h
Ganglionektomiert + LD	9.6 (±1.5)	44.1 (± 7.6)
Scheinoperiert + LD	8.7 (±3.8)	63.1 (±15.1)
Unbehandelt + LD	6.9 (±4.3)	95.1 (±38.7)

Jeder Wert (± Standardabweichung) ist das Mittel aus Werten von 4 Tieren. Alle Werte um 24^h sind signifikant verschieden ($p < 0.01$) von den entsprechenden Werten um 12^h. Siehe auch Exptl. Teil, S. 72.

Der Unterschied zwischen den Mittags- und Mitternachtswerten ist bei allen drei Gruppen hochsignifikant ($p < 0.01$). Da für 28 Tage alte Ratten im wesentlichen identische Daten erhalten wurden, kann auf die Wiedergabe dieser Werte verzichtet werden. Das Ergebnis deutet daraufhin, daß die Epiphyse nicht an der Regulation des Enzymrhythmus beteiligt ist. Es wurde berichtet, daß der epiphyseale Serotoninrhythmus bei 60 Tage alten (adulten), jedoch nicht bei 28 Tagen alten (unreifen) Ratten abhängig ist von der sympathischen Innervation der Epiphyse (84). Daher ist bei den Ratten,

die in unserem Experiment verwendet wurden (intermediäres Alter von 45 Tagen), der Status der epiphysealen Innervation unklar (84). Nimmt man an, die Ratten unseres Experiments verhielten sich wie unreife Tiere, dann würde der epiphyseale Serotoninrhythmus noch nicht von der Innervation abhängig sein und daher durch die Ganglionektomie nicht beeinflusst werden. Jedoch erscheint eine ursächliche Beziehung zwischen den Rhythmen der hepatischen HMG-CoA-Reduktase und des epiphysealen Serotonins unwahrscheinlich, da nur letzterer im Dauerlicht ausgelöscht ist (84). Andererseits kann man annehmen, daß die von uns verwendeten Ratten mit adulten Tieren verglichen werden können. In adulten Tieren persistiert der epiphyseale Serotoninrhythmus im Dauerdunkel, jedoch nicht im Dauerlicht (85). Da der Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase im Dauerlicht und im Dauerdunkel weiter fortbesteht, kann das epiphyseale Serotonin nicht für die Regulation des HMG-CoA-Reduktase Rhythmus verantwortlich sein. Auch der zum Serotoninrhythmus invers verlaufende Melatoninrhythmus kann nicht Ursache des Rhythmus der Reduktase sein: Der Rhythmus der Aktivität des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Melatonsynthese ist im Dauerlicht, jedoch nicht im Dauerdunkel unterdrückt (60).

b) Einfluß der Hypophysektomie (siehe Exptl. Teil, S. 72).

Einige Befunde in der Literatur (16, 17) weisen darauf hin, daß die Hypophyse eine wichtige Rolle bei der Regulation der Cholesterogenese spielt. Da alle physiologisch wichtigen regulatorischen Mechanismen in der hepatischen Cholesterolsynthese auf der Ebene der HMG-CoA-Reduktase stattfinden, erschien es sehr wahrscheinlich, daß auch die Hypophyse die Cholesterogenese durch dieses Enzym beeinflusst. Wir untersuchten deshalb den Einfluß der Hypophysektomie auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase. Im Verlauf dieser Untersuchungen wurden von einem anderen Labor Ergebnisse berichtet, wie auch wir sie erhalten hatten (86).

Die Körpergewichte hypophysektomierter Ratten änderten sich während der genannten Versuchsdauer nicht signifikant (0.6g/24 h) (Fig. 11, Kurve I). Auf der anderen Seite nahmen scheinoperierte Ratten - wie normale Ratten - 6.9 g/24 h zu (Fig. 11, Kurve II). Da die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Lebern hungernder Ratten

stark vermindert ist (34), ist es wichtig, die Höhe der Futteraufnahme während des Tages vor dem Schlachten zu kennen. Am 8. postoperativen Tag fraßen hypophysektomierte Ratten nur 19 % weniger als scheinoperierte Ratten (14.8 g/100 g Körpergewicht).

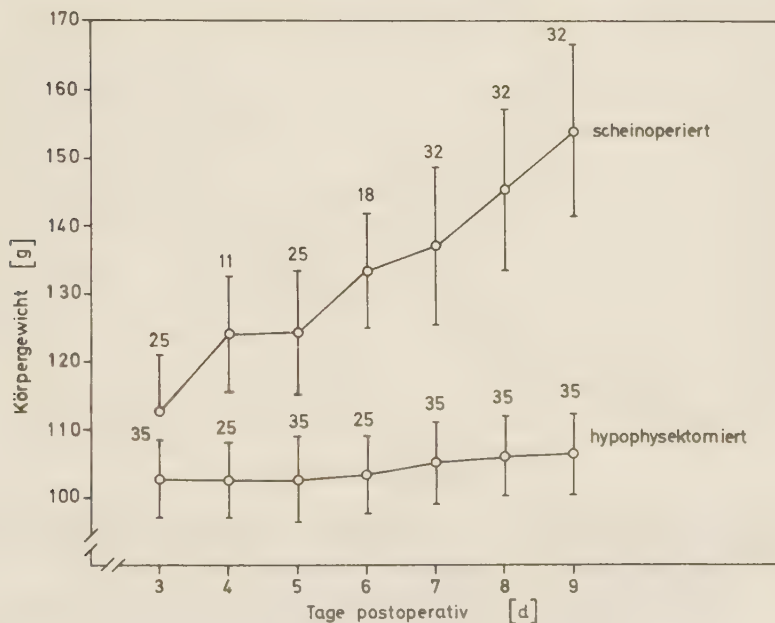


Fig. 11. Körpergewichte von hypophysektomierten und scheinoperierten Ratten während der postoperativen Periode (Tage 3 - 9) gemessen um 19^h. Bei jedem Mittelwert ist die Zahl der Tiere und die Standardabweichung angegeben.

Die Verteilung der Futteraufnahme von hypophysektomierten und scheinoperierten Ratten über eine 18 h - Periode des 9. postoperativen Tages zeigt keine signifikanten Unterschiede (Fig. 12).

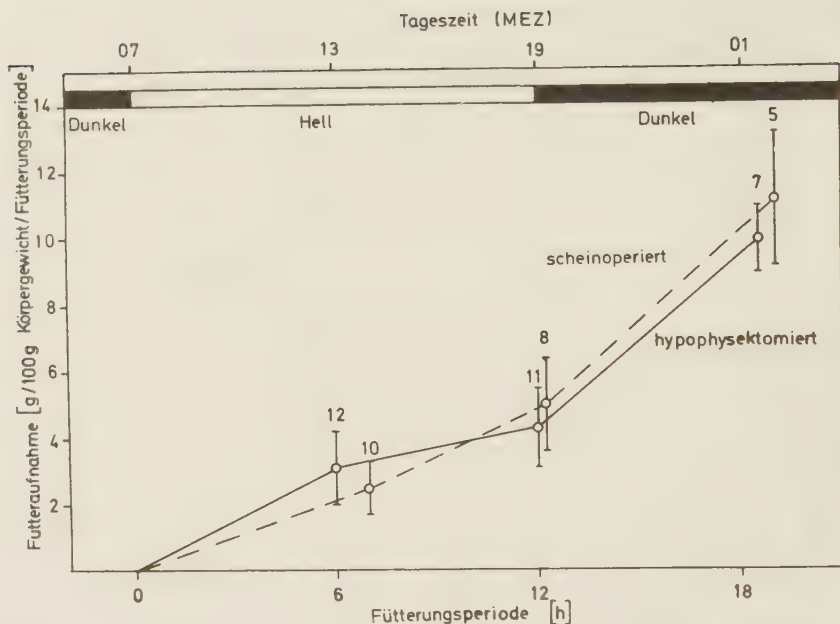


Fig. 12. Futteraufnahme von hypophysektomierten und scheinoperierten Ratten am 9. postoperativen Tag.

Zur Messung der Futteraufnahme wurden die Ratten individuell in Käfigen gehalten, die in zwei Kompartimente aufgeteilt waren. Die Absolutmenge des 18-stündigen Futterverbrauchs von hypophysektomierten und scheinoperierten Ratten betrug 9.9 g und 10.6 g pro 100 g Körpergewicht. Die verwendeten Tiere sind mit den Gruppen von Fig. 11 identisch.

Die Plasmacorticosteron-Spiegel in hypophysektomierten Ratten - neben Wachstumsstillstand ein gutes Kriterium für erfolgreiche Hypophysektomie - liegen an der unteren Meßgrenze; hingegen sind sie normal hoch in scheinoperierten Ratten (Fig. 13).

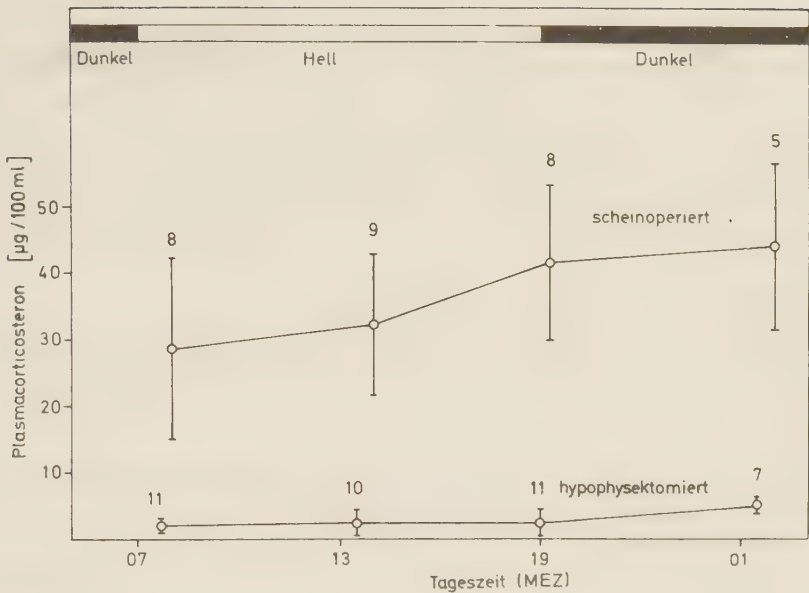


Fig. 13. Plasmacorticosteronspiegel von hypophysektomierten und scheinoperierten Ratten zu verschiedenen Tageszeiten. Die Tiere wurden am 9. postoperativen Tag getötet. Sie sind identisch mit den Gruppen von Fig. 11. Weitere Details siehe Fig. 12 und Exptl. Teil, S. 72.

Während die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in scheinoperierten Ratten periodisch mit der Tageszeit variiert, ist sie in hypophysektomierten Ratten invariabel niedrig (Fig. 14).

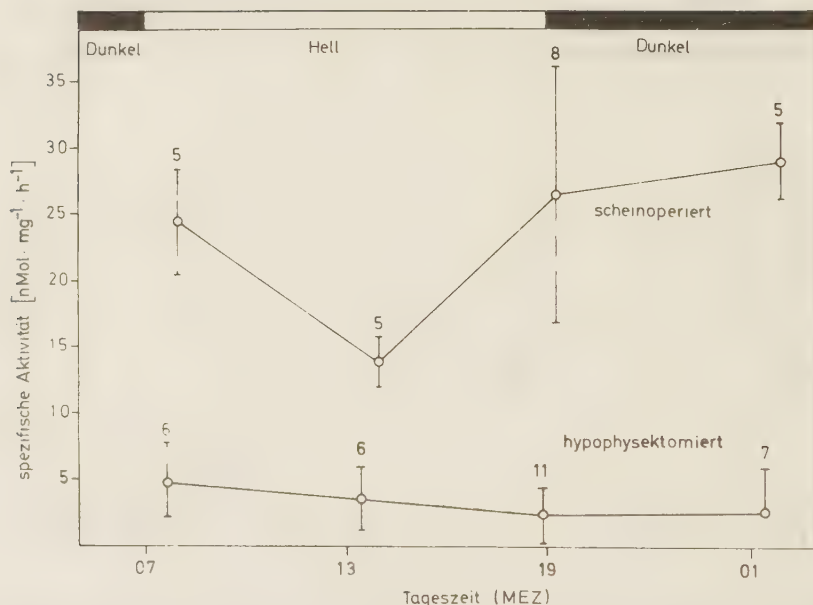


Fig. 14. Tageszeitliches Aktivitätsmuster der HMG-CoA-Reduktase in hypophysektomierten und scheinoperierten Ratten. Weitere Details siehe Fig. 13.

c) Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase in adrenaletomierten Ratten (126)

ACTH veranlaßt die Nebennierenrinde Corticosteron zu bilden. In Ratten und Mäusen erreicht der Plasmaspiegel des ACTH (82) - und damit auch der des Corticosterons (87-89) sein Maximum gegen Ende der Hellperiode. Der nach Hypophysektomie eintretende ACTH-Mangel bringt die Corticosteronproduktion der Nebenniere zum Erliegen. Als Folge davon sinkt auch der Corticosterongehalt im Blut (siehe Fig. 13, S. 29). Wir untersuchten deshalb den Einfluß von Adrenaletomie auf den Aktivitätsrhythmus der HMG-CoA-Reduktase. Die adrenaletomierten Tiere nahmen 1-2 Tage nach dem operativen

Eingriff wenig Futter auf und verloren an Körpergewicht. In den folgenden Tagen erholten sich die Tiere aber rasch. Sie fraßen bedeutende Mengen Futter und ihr Körpergewicht stieg. Am 6. und 7. postoperativen Tag waren Futteraufnahme und Gewichtszunahme von scheinoperierten und unbehandelten Tieren nahezu gleich (Tabelle 3). Die Futteraufnahme der adrenaletomierten Tiere war um weniger als 20 % gegenüber den beiden Vergleichsgruppen abgesunken, während die Gewichtszunahme nur halb so groß war wie die der Kontrolltiere.

Tabelle 3

Tägliche Futteraufnahme und Gewichtszunahme von adrenaletomierten, scheinoperierten und unbehandelten Ratten.

Behandlung	Zahl der Tiere	Futteraufnahme [g/120 g Körper- gewicht/24 h]	Gewichts- zunahme je Ratte [g/24 h]
Adrenaletomiert	20	12.8	2.9
Scheinoperiert	18	15.5	5.0
Unbehandelt	8	14.6	5.8

Die Daten wurden am 6. und 7. postoperativen Tag an ca. 120 g schweren Tieren erhalten. Es wurden 3 - 4 Ratten pro Käfig gehalten. Die Futteraufnahmen wurden pro Käfig gemessen und dann umgerechnet. Es werden Mittelwerte aus Messergebnissen mitgeteilt, die an der entsprechenden Zahl von Versuchstieren erhalten wurden.

Die HMG-CoA-Reduktase-Aktivitäten zu vier verschiedenen Tageszeiten des 8. postoperativen Tages sind in Fig. 15 dargestellt. Offensichtlich beeinflusst Adrenaletomie den Rhythmus des Enzyms nicht, da Aktivitätsmaxima und -minima von ektomierten und scheinoperierten Tieren gleich sind.

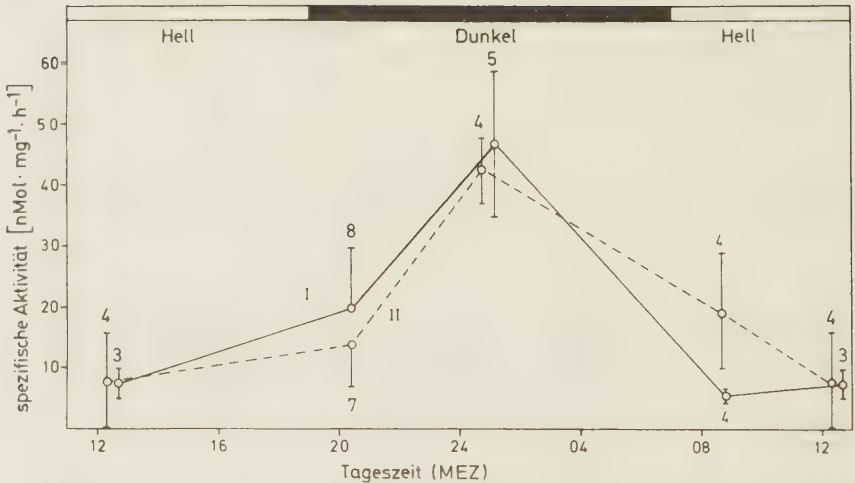


Fig. 15. Abhängigkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von der Tageszeit bei scheinooperierten (Kurve I) und adrenalectomierten (Kurve II) Ratten. Bei jedem Mittelwert ist die Anzahl der Messungen und die Standardabweichung angegeben. Die Tiere wurden 8 Tage nach der Operation getötet.

Daß die Tiere der Versuchsgruppe tatsächlich adrenalectomiert waren, konnte durch Messung des Plasmacorticosterons (90, 91) nachgewiesen werden (Fig. 16). Übereinstimmend mit der Literatur (92-94) weisen die adrenalectomierten Tiere niedrige ($7.8 \pm 3.1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; Extremwerte 2 bzw. $13 \mu\text{g}/\text{ml}$) und die beiden Kontrollgruppen hohe Plasmacorticosteron-Werte (niedrigster Wert $27 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) auf. Daß bei den adrenalectomierten Tieren überhaupt noch "Corticosteron" gemessen wird, ist

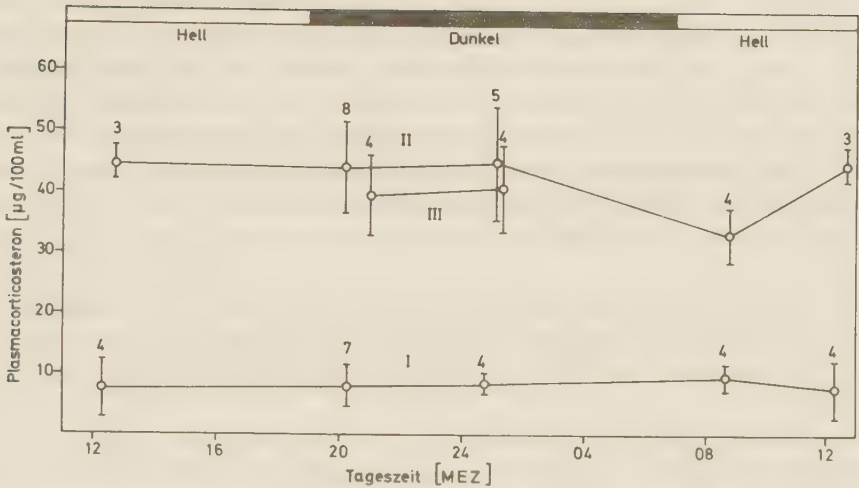


Fig. 16. Plasmacorticosteron-Spiegel der Ratten zu verschiedenen Tageszeiten.

I: Adrenalektomierte, II: scheinoperierte, III: unbehandelte Ratten. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus der angegebenen Zahl von Einzelmessungen.

methodisch bedingt und resultiert aus der bei diesen fluorimetrischen Methoden bekannten Basisfluoreszenz (90 - 93), wobei auch die Mitreaktion anderer Steroide (z.B. Androgene) zu berücksichtigen ist (95). Die Höhe der Werte ist bei allen 3 Gruppen nahezu unabhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme. Dies leuchtet für die adrenalektomierten Tiere unmittelbar ein, da das erzeugende Organ fehlt. Bei scheinoperierten Tieren (Fig. 16) ist der Widerspruch zu dem in der Literatur angegebenen tageszeitlichen Rhythmus des Plasmacorticosterons nur scheinbar. Um den Rhythmus des Plasmacorticosterons messen zu können, muß man bei der Gewinnung des Blutes möglichst "stress" - frei arbeiten. Andernfalls wird die Nebenniere durch vermehrt aus der Adenohypophyse freigesetztes Adrenocorticotropin zur raschen Ausschüttung von Corticosteron

stimuliert, d. h. der Plasmacorticosteron-Spiegel wird stark erhöht (96, 97). In vorliegender Arbeit aber war "stress" gerade erwünscht, um eventuell unvollständiger Adrenalektomie dadurch auf die Spur zu kommen, daß die Nebennierenreste zu maximaler Ausschüttung von Corticosteron veranlaßt würden. Bei den scheinoperierten und intakten Tieren wurden wegen der von uns verwendeten Methode der Blutentnahme zu allen Tageszeiten Maximalwerte des Corticosteron-Spiegels gefunden. Andererseits belegen die einheitlich niedrigen Werte bei allen adrenalektomierten Tieren (Fig. 16, Kurve I) die Vollständigkeit der Adrenalektomie.

Adrenalektomie beeinflußt weder die Aktivität noch die Rhythmizität der HMG-CoA-Reduktase. Dies deutet daraufhin, daß die adrenalen Hormone nicht an der Regulation des Enzymrhythmus beteiligt sind.

Unter Bedingungen, die von den unseren abweichen, wurden in 2 Laboratorien Ergebnisse erhalten, die auf unterschiedliche Beteiligungen der adrenalen Hormone an der Regulation der Cholesterogenese hinweisen (86, 98). Edwards (86) fand in adrenalektomierten Ratten invariabel niedrige Reduktase-Aktivitäten zu verschiedenen Zeiten des 21. postoperativen Tages. Die Schlußfolgerung des Autors, Adrenalektomie bewirke Auslöschung des Enzymrhythmus erscheint jedoch in zweifacher Hinsicht zweifelhaft: a) wurden die Werte an Versuchstieren unterschiedlichen Körpergewichts erhalten (150 - 350 g), b) wurde versäumt, unmittelbar vor dem Töten den Ernährungsstatus der zur Messung der Enzymaktivität der verwendeten Tiere zu untersuchen. Da in der Ratte mit zunehmenden Alter (Körpergewicht) die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase auf sehr niedrige Werte absinkt (30) und die Nahrungsaufnahme des Tieres mitbestimmend für die Aktivität dieses Enzyms ist (34), entziehen sich die Daten Edwards' einer eindeutigen Interpretation, zumal der Nachweis für die Vollständigkeit der Adrenalektomie bei den von Edwards verwendeten Tieren nicht erbracht wurde. Darüberhinaus blieb der Versuch, die Reduktase-Aktivität in adrenalektomierten Ratten durch Zufuhr von adrenalen Hormonen zu stimulieren erfolglos (96). Hickmann et al. (98) fanden bei Acetateinbaustudien in Cholesterol, daß die hepatische Cholesterolsynthese in adrenalektomierten Ratten mittags und mittenachts mit maximaler Ge-

schwindigkeit verläuft. Das von ihnen beobachtete Verschwinden der Periodizität der Cholesterolsynthese muß nicht notwendigerweise Auslöschung des Rhythmus bedeuten; auf Grund der 2 vorliegenden gleich hohen Werte der Cholesterolsyntheserate um 12^h und 24^h (98) wäre es ebenso gut denkbar, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Phasenverschiebung des Rhythmus eingetreten ist, dessen nunmehr angehobenes Maximum zwischen 12^h und 24^h liegt. Eine andere Arbeitsgruppe berichtete kürzlich in Übereinstimmung mit unserem Ergebnis, daß Adrenalektomie den Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nicht beeinflusst (99) (siehe auch Diskussion S. 56).

d) Versuche zur Restauration hoher Reduktaseaktivitäten in hypophysektomierten Ratten.

Die nachfolgenden Experimente wurden unternommen, um herauszufinden, welche Hormone hypophysektomierten Ratten zur Restauration hoher Reduktase-Aktivitäten zugeführt werden müssen.

Einfluß von Trijodthyronin: Als guter Kandidat erschien uns das Schilddrüsenhormon, dessen Produktion und Sekretion vom thyroïd-stimulierenden Hormon der Hypophyse kontrolliert wird, und dessen Gehalt im Blut die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in der Leber bestimmt (32, 33). Deshalb wurde nach Guder et al. (32, 33) Trijodthyronin in hypophysektomierte Ratten injiziert. Wie erwartet (32, 33) stieg die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase nach einer Verzögerungsperiode von 6-24 h zu hohen Werten an (Fig. 17, Kurve II).

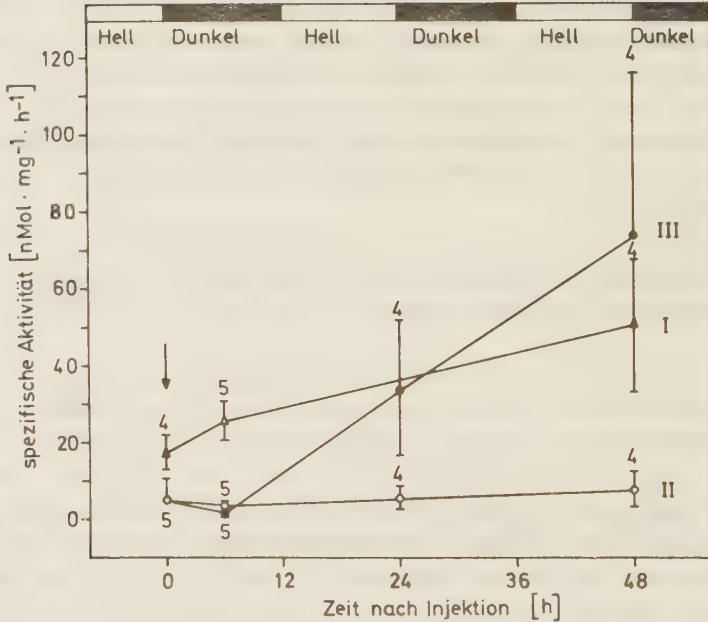


Fig. 17. Trijodthyronin und HMG-CoA-Reduktase in hypophysektomierten Ratten.

Um 19^h des 9. postoperativen Tages erhielten 2 Gruppen von hypophysektomierten und eine Gruppe von scheinooperierten Ratten einmalige Injektionen von 0.1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Lösung, die eine Gruppe von hypophysektomierten Ratten eingespritzt wurde, enthielt 50 µg Trijodthyronin. Bei jedem Punkt sind Anzahl der Ratten und Standardabweichungen angegeben.

Δ Scheinooperiert, ○ hypophysektomiert,

● hypophysektomiert + Trijodthyronin.

Zwei Tage nach Injektion des Hormons waren die Enzymaktivitäten vergleichbar mit den Werten, die in scheinooperierten Ratten gefunden wurden (Fig. 17, Kurve I). Ähnlich dem früheren Experiment

(Fig. 14, S. 30) blieb die Enzymaktivität niedrig in hypophysektomierten Ratten, denen nur physiologische Kochsalzlösung eingespritzt wurde (Fig. 17, Kurve II).

Einfluß von Wachstumshormon. Frühere Experimente zeigten, daß die Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese bei Leberschnitten (55) und die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase (30) vom Alter und damit von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig sind. Diese Ergebnisse ermutigten uns, den Einfluß eines weiteren Hypophysenhormons, Wachstumshormon, auf die Aktivität des Enzyms zu untersuchen. Gruppen von hypophysektomierten Ratten erhielten 3 Tage lang einmal täglich Injektionen eines Präparats von menschlichem Wachstumshormon oder physiologischer Kochsalzlösung. Der Vergleich der Kurven II und III (Fig. 18, oberer Teil) zeigt, daß nur jene hypophysektomierten Ratten wieder zu wachsen begannen, die mit dem Hormonpräparat behandelt wurden. Ihre Wachstumsgeschwindigkeit (Fig. 18, oberer Teil, Kurve III) gleicht der scheinoperierter Tiere. Damit ist die physiologische Wirksamkeit des Wachstumshormonpräparats erwiesen. Die tägliche Futteraufnahme hypophysektomierter Ratten (Fig. 18, unterer Teil, Kurve II), etwas niedriger als die scheinoperierter Ratten (Kurve I), ist nach Zufuhr von Wachstumshormon leicht erhöht (Kurve III).

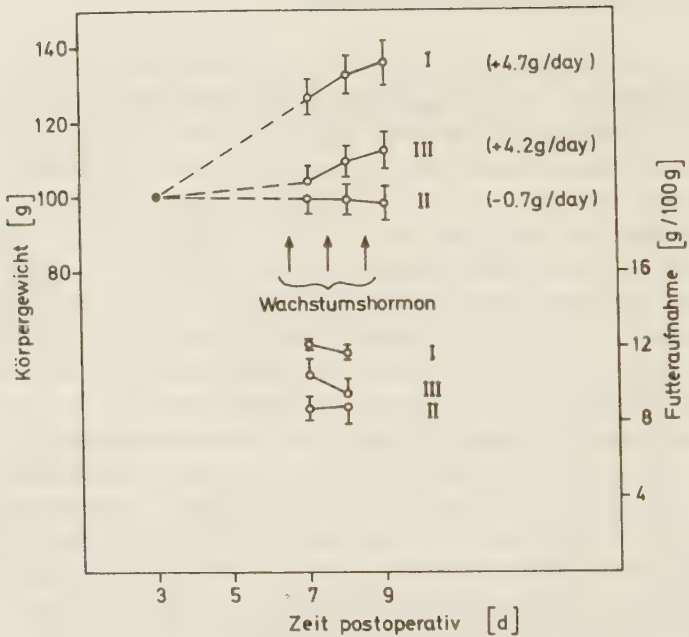


Fig. 18. Einfluß von Wachstumshormon auf Körpergewichte und Futteraufnahme hypophysektomierter Ratten.

Zu den durch Pfeile angezeigten Zeiten erhielten Gruppen von hypophysektomierten Tieren intraperitoneale Injektionen von Wachstumshormon in physiologischer Kochsalzlösung (1 mg/ml, 1 ml/100 g Körpergewicht; Kurven III), oder Kochsalzlösung allein (Kurven II). Den Kontrollgruppen scheinoperierter Ratten wurde nur physiologische Kochsalzlösung eingespritzt (Kurven I). Die Körpergewichte am 3. postoperativen Tag wurden auf 100g normalisiert. Die in der Figur angegebenen Wachstumsgeschwindigkeiten sind die mittleren täglichen Gewichtszunahmen vom 7. - 9. postoperativen Tag, bezogen auf 100 g Körpergewicht. Die Werte sind das Mittel ($\pm$ Standardabweichung) aus Messwerten, die an 14 (Kurven II und Kurven III) bzw. 9 Ratten (Kurven I) gewonnen wurden.

Dieselben Tiere, bei denen die Messungen der Körpergewichte und Futteraufnahme vorgenommen wurden, dienten zur Bestimmung der HMG-

CoA-Reduktase-Aktivität. Die wiederholte Hormonbehandlung (s.o.) verursachte in hypophysekтомierten Ratten einen starken Anstieg der HMG-CoA-Reduktase (Fig. 19, Kurve III) bis zu den Kontrollwerten scheinoperierter Tiere (Kurve I). Die Enzymaktivität hypophysekтомierter Ratten, denen nur physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde, blieb erwartungsgemäß niedrig (Kurve II).

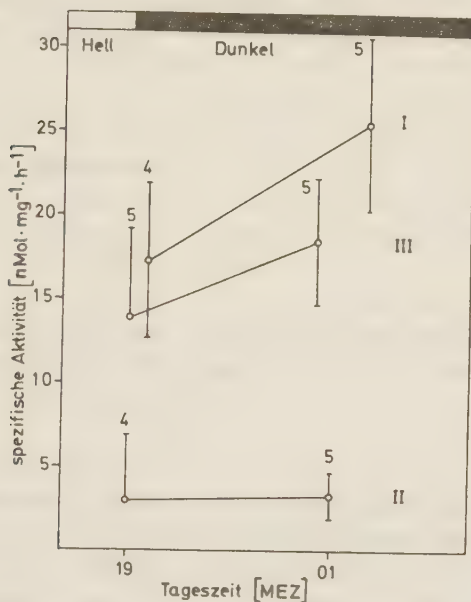


Fig. 19. Wachstumshormon und Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in hypophysekтомierten Ratten.

Eine Gruppe von Tieren wurde am 9. postoperativen Tag jeweils um ca. 19^h und eine entsprechende Gruppe 6 h später getötet. Bei den Enzymaktivitäten sind Anzahl der Tiere und die Standardabweichung vom Mittelwert angegeben.

Kurve I: scheinoperiert.

Kurve II: hypophysekтомiert.

Kurve III: hypophysekтомiert + Wachstumshormon (1 mg/100g Körpergewicht). Die Werte von Kurve I und III sind um 19^h signifikant ($p < 0.05$) und um 1^h hochsignifikant ($p < 0.001$) verschieden von den entsprechenden Werten der Kurve II.

Weitere Details siehe Legende von Fig. 18.

Bei hypophysektomierten Tieren, die nur einmal um 19^h des 9. postoperativen Tages mit dem Hormonpräparat behandelt wurden, war die Enzymaktivität 6 h nach Injektion so niedrig wie um 19^h (Tabelle 4).

Tabelle 4

Spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase hypophysektomierter Ratten nach einmaliger Behandlung mit einem Wachstumshormonpräparat.

Behandlung	Spezifische Aktivität [nMol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹]
scheinoperiert + Placebo	28.4 (±11.7)
hypophysektomiert + Placebo	6.4 (± 2.4)
hypophysektomiert + 1 x Wachstumshormon	7.4 (± 3.9)

Die Placebo-Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung oder die Injektion des Wachstumshormon-Präparats (1 mg/100 g Körpergewicht, intraperitoneal) wurden um 19^h des 9. postoperativen Tages vorgenommen. 6 h später wurden die Tiere getötet. Die Werte sind Mittelwerte (± Standardabweichung) von 4 - 5 Ratten. Die Werte von der Gruppe "hypophysektomiert + Placebo" bzw. "hypophysektomiert + 1 x Wachstumshormon" sind signifikant verschieden von den Werten der Gruppe "scheinoperiert + Placebo".

Die im Handel erhältlichen Wachstumshormon-Präparate enthalten weitere Hypophysenhormone als Verunreinigung, jedoch fehlten Angaben über das von uns verwendete Präparat. Bei ausreichend hohem Gehalt an TSH wäre die gefundene Wirkung des Wachstumshormon-Präparats zumindest teilweise auf diese Verunreinigung rückführbar, wenn man die Abhängigkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität vom Thyroidhormonspiegel bedenkt (32, 33). Die Analyse des verwendeten

Präparats ergab eine TSH-Kontamination von 0.003 % (Angaben des Herstellers, s. auch Exptl. Teil S. 73). Bei hypophysektomierten Ratten ist die geringste physiologisch wirksame Menge 8 ng TSH pro Tier (100). Die in unserem Experiment mit dem Wachstumshormon-Präparat zugeführte TSH-Menge (30 ng/100 g Körpergewicht) würde ausgereicht haben, die Produktion von Thyroidhormonen in der Schilddrüse der hypophysektomierten Ratte anzuregen. Der gefundene stimulierende Einfluß des verwendeten Hormon-Präparats würde bereits allein über seine Verunreinigung an TSH erklärbar sein. Dafür spricht auch der - für Thyroidhormon charakteristische - verzögerte Eintritt der Wirkung (Fig. 17, S. 36). Die Frage, ob reinstes Wachstumshormon die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase beeinflusst, läßt sich an Hand der vorliegenden Ergebnisse nicht beantworten, und müßte z. B. an hypophysektomierten hypothyreoten Ratten untersucht werden.

e) Wirkung von Insulin und Glukagon auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in normalen (127), diabetischen (127) und in hypophysektomierten Ratten.

Die Rhythmen der Plasmainsulin-Spiegel (82) und der hepatischen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (34 - 37, 41) der Ratte verlaufen parallel. Mehrere Berichte in der Literatur deuteten auf eine wichtige Rolle des Insulins bei der Regulation der Cholesterogenese in der Leber (22 - 25) und veranlaßten uns, den Einfluß dieses Hormons auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase zu untersuchen. Geraume Zeit nach Abschluß dieser Untersuchung erschienen 2 Publikationen die unsere im folgenden beschriebenen Ergebnisse bestätigten (101, 102).

Zum Studium des Insulineinflusses auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase eignen sich Ratten, deren pankreatische β -Zellen durch Alloxan zerstört wurden. Wie Kontrolltiere nahmen Alloxan-diabetische Ratten an Körpergewicht zu, wenn sie Insulin erhielten und verloren an Gewicht, wenn Insulin fehlte. Jedoch fraßen Alloxan-diabetische Tiere, die kein Insulin erhielten nur 30 % weniger als Insulin-behandelte und nur 20 % weniger als normale Kontrolltiere. Die in diabetischen Ratten stark erhöhten Plasma-glucose-Spiegel wurden durch Insulin sogar unter die Normalwerte

unbehandelter Kontrolltiere gesenkt (Fig. 20).

Die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität diabetischer Ratten war niedrig. Insulininjektionen erhöhten die spezifische Aktivität des Enzyms zu Werten, die bei normalen unbehandelten Kontrolltieren gefunden wurden (Fig. 20 B). Insulininjektion um 18^h steigerte die spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase nicht nur in diabetischen sondern auch in normalen Ratten (Fig. 21 A). Nach Verabreichung des Insulins stieg die spezifische Aktivität des Enzyms in der ersten Stunde auf das 5-fache an, nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung aber nur auf das 2.5-fache.

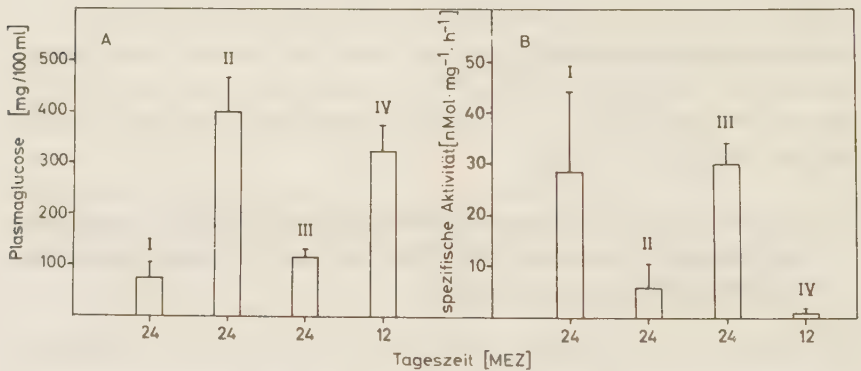


Fig. 20. Plasmaglucoosespiegel und spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase bei Insulin-behandelten und unbehandelten Ratten.

Teil A: Plasmaglucoose-Spiegel. Teil B: Spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase. Um 18^h des dritten Tages nach Verabreichung von Alloxan (Insulinbehandlung vor dieser Zeit siehe Exptl. Teil, S. 73) wurde einer Tiergruppe Insulin gegeben (4 i.u./100 g Körpergewicht, subcutan, I), während eine andere Gruppe physiologische Kochsalzlösung erhielt (II). Eine dritte Gruppe von normalen unbehandelten Tieren (mit physiologischer Kochsalzlösung injiziert) diente als Kontrolle (III). Die Tiere wurden 6 h später getötet. Eine vierte Gruppe von Ratten (Alloxan-diabetisch; mit physiologischer Kochsalzlösung injiziert) blieb für weitere 18 h ohne Insulin, und wurde um 12^h des 4. Tages nach Alloxaninjektion getötet. Die Werte sind Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) aus Messungen an 7 Ratten (II in A) bzw. 8 Ratten (II in B, IV in A und B). Die Werte von II unterscheiden sich signifikant von denen von I und III in A und B ($p < 0.01$ - 0.001).

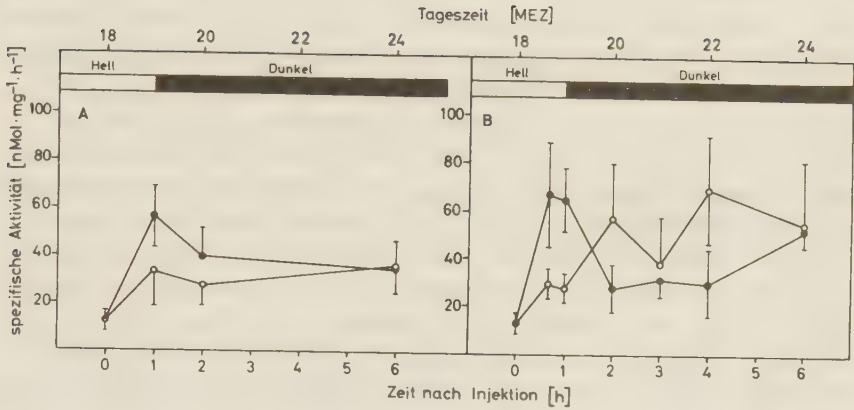


Fig. 21. Einfluß einer einzelnen Injektion von Insulin (A) oder Glucagon (B) auf die spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase. ● Insulin (A), Glukagon (B), ○ physiologische Kochsalzlösung. Die Werte sind Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung aus Messungen an 6 Ratten (A, $t = 0$), 7 Ratten (B, $t = 0$) und 4 Ratten (A und B, alle anderen Zeiten). Die Werte beider Kurven (Teil A) sind signifikant ($p < 0.05$) oder hochsignifikant ($p < 0.01$) verschieden vom Wert bei $t = 0$. In Teil B sind folgende Werte der Kontroll- und Versuchsgruppen signifikant oder hochsignifikant verschieden:

$t = 40 \text{ min}$ ($p < 0.02$), $t = 1 \text{ h}$ ($p < 0.01$), $t = 4 \text{ h}$ ($p < 0.05$). Nähere Einzelheiten siehe Exptl. Teil S. 73.

Dann sank sie während der nächsten 5 h auf den erhöhten Wert, den die Kontrollgruppe inzwischen erreicht hatte. Der Anstieg der spezifischen Aktivität zwischen 18^h und 24^h entspricht dem gewohnten tageszeitlichen Anstieg der Enzymaktivität.

Verwendeten wir in einem derartigen Experiment Glucagon anstelle von Insulin, so wurde 40 min nach Injektion ein gleich hoher Anstieg (5-fach) beobachtet (Kontrollwerte: 2.3fach nach Placebo-Injektion). Anschließend sanken die Werte unter die Kontrollwerte und erreichten 6 h nach den Injektionen wieder die Höhe der Kontrollwerte (Fig. 21 B).

Bei Alloxan-diabetischen Ratten, die kein Insulin erhielten, sank das Körpergewicht schnell ab, obwohl die Futteraufnahme im Vergleich zu normalen Kontrollratten oder insulinbehandelten diabetischen Ratten nur mäßig reduziert war. Da die Alloxan-diabetischen Tiere nach Insulinentzug Durchfall bekamen, könnte der Verlust des Körpergewichts durch verminderte Resorption von Futter und Wasser verursacht worden sein. Das könnte bedeuten, daß die niedrigen Enzymaktivitäten unter diesen Bedingungen durch einen partiellen Fasteneffekt bedingt sind (28). Ferner könnte der Insulin-abhängige Anstieg der HMG-CoA-Reduktase als eine Folge der Restauration der intestinalen Absorption von Futter interpretiert werden. Da jedoch auch normale (nicht-diabetische) Tiere auf Insulin ansprachen (Fig. 21 A) trifft diese Interpretation sehr wahrscheinlich nicht zu. Vielmehr scheint Insulin direkt auf die Leber zu wirken.

Es wäre nun interessant zu erfahren, ob Insulin wie bei Alloxan-diabetischen Ratten auch bei hypophysektomierten Ratten die niedrigen HMG-CoA-Reduktase-Aktivitäten wieder anheben kann. 6 h nach Injektion von Insulin waren die Plasmaglukose-Spiegel hypophysektomierter Ratten sehr niedrig; die Tiere beider Kontrollgruppen besaßen dagegen Plasmaglukosewerte, wie sie in normalen Ratten gefunden wurden (Tabelle 5). Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase blieb niedrig (Tabelle 5).

Tabelle 5

Plasmaglucoſe-Spiegel und HMG-CoA-Reduktase-Aktivität hypophyſektomierter Ratten nach Insulininjektion.

Behandlung	Plasmaglucoſe [mg/100 ml]	ſpezifische Aktivität [nMol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹]
ſcheinoperiert + Placebo	132 (±24)	28.4 (±11.7)
hypophyſektomiert + Placebo	139 (± 7)	6.4 (± 2.4)
hypophyſektomiert + Insulin	42 (±16)	4.9 (± 1.9)

Um 18^h des 9. poſtoperativen Tages erhielten Gruppen von Ratten entweder Placeboinjektionen mit phyſiologiſcher Kochſalzlöſung oder Insulininjektionen (4 i.u. Depot-Insulin/100 g Körperge-
wicht). Sechs Stunden ſpäter wurden die Tiere geötet. Die ange-
gebenen Werte ſind Mittelwerte (± Standardabweichung) aus Mes-
ſungen an 4 - 5 Ratten.

f) Trijodthyronin und HMG-CoA-Reduktase Aktivität Alloxan-diabe-
tiſcher Ratten.

Trijodthyronin ſteigert die niedrigen HMG-CoA-Reduktase-Aktivitä-
ten hypophyſektomierter Ratten auf ſehr hohe Werte (S. 36). Es
wäre wichtig zu wiſſen, ob Trijodthyronin die Reduktase-Aktivität
Alloxan-diabetiſcher Ratten erhöht. Tabelle 6 zeigt, daß Alloxan-
diabetiſche Tiere und Alloxan-diabetiſche Tiere, die mit Trijod-
thyronin behandelt wurden, hohe Plasmaglucoſe-Spiegel beſaßen. Die
HMG-CoA-Reduktase-Aktivität Alloxan-diabetiſcher Tiere war ver-
hältnismäßig niedrig. Die Injektion von Trijodthyronin erhöhte die
ſpezifische Aktivität des Enzyms auf Werte, wie ſie bei Insulin-
behandelten Alloxan-diabetiſchen Tieren gefunden wurden. Kombi-
nation von Trijodthyronin und Insulin ſteigerte die Aktivität des
Enzyms nicht mehr deutlich. Ein Grund für die unerwartet hohen

Kontrollwerte der Reduktase-Aktivität könnte sein, daß die Alloxan-diabetischen Tiere noch Insulin enthielten. Dieser Verdacht wird bekräftigt durch die Tatsache, daß die Plasmaglukose-Spiegel mit 318 bzw. 351 mg/100 ml um 12 -20 % niedriger liegen als im früheren Experiment (vergl. Tabelle 6 u. S. 42, Fig. 20).

Tabelle 6

Plasmaglukose-Spiegel und Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Alloxan-diabetischen Ratten nach Injektion von Trijodthyronin.

Gruppe	Behandlung (Vorbehandlung siehe Legende Tabelle 6 u. S. 73)	Anzahl der Ver- suchs- tiere	Plasmaglukose [mg/100 ml]	spezifische Aktivität ₁ [nMol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹]
1	-	5	318(± 28)	22.2(± 5.5)
2	Insulin	5	49(± 10)	79.5(±31.1)
3	Trijodthyronin	3	351(±105)	62.1(±11.4)
4	Trijodthyronin + Insulin	6	51(± 13)	81.3 (±29.1)

Der Alloxan-Diabetes wurde nach der im Experimentellen Teil beschriebenen Methode erzeugt (S. 73). 32 h nach der Alloxan-Injektion erhielten 4 Gruppen Alloxan-diabetischer Ratten einmalige subcutane Injektionen von 0.1ml physiologischer Kochsalzlösung pro 100g Körpergewicht; die Lösung, die der Gruppe 3 und 4 eingespritzt wurde, enthielt ferner 50 µg Trijodthyronin pro 0.1 ml Lösung. Um 18^h des dritten Tages nach Verabreichung von Alloxan (Insulinbehandlung vor dieser Zeit siehe Exptl. Teil S. 73) wurde den Gruppen 2 und 4 Insulin (4 i.u./100g Körpergewicht) gegeben, während die übrigen Gruppen (1 und 3) physiologische Kochsalzlösung erhielten. Die Tiere wurden 7 h später (55 h nach Injektion von Trijodthyronin) getötet. Das Körpergewicht der Tiere war zum Zeitpunkt des Todes 170 -180 g. Bei jedem Mittelwert ist die Standardabweichung angegeben.

3. Versuche zur Interkonvertierbarkeit der HMG-CoA-Reduktase.

Ungewißheit herrschte über die Frage, ob die HMG-CoA-Reduktase, ähnlich anderen Enzymen chemisch modifizierbar ist, (z. B. Interkonversion durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung). Bricker und Levey (27) berichteten, daß cyclo-AMP die Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese in Leberschnitten hemmt, was auf eine Inaktivierung der HMG-CoA-Reduktase durch Phosphorylierung hindeutet. Um zu prüfen, ob die Bedingungen, die einer Phosphorylierung förderlich sind, zu einer Inaktivierung des Enzyms führen wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Versuche unternommen. Verglichen mit den Kontrollen (Tabelle 7, Vers. Nr. 1) ergab die Präinkubation mit dem vollständigen Reaktionsgemisch (Vers.Nr. 2) 80 % niedrigere Werte der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität. Abwesenheit von cyclo-AMP oder Theophyllin, eines Inhibitors von cyclo-AMP abbauenden Phosphodiesterasen, änderte daran nichts, während bei Abwesenheit von Fluoridionen die Hemmung der Enzymaktivität geringer war. Die Erniedrigung der Enzymaktivität trat bereits ein, wenn mit Mg^{2+} , ATP und dem ATP regenerierenden System Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase präinkubiert wurde. Fehlte ATP im Reaktionsgemisch, dann entsprach die Enzymaktivität dem Kontrollwert. Entsprechend Vers. Nr. 2 (Tabelle 7) präinkubierte Mikrosomen besaßen nach 1 stündiger erneuter Inkubation mit einem frischen (partikelfreien) 10^5g -Überstand wieder die spezifische Aktivität der Kontrolle (entsprechend Vers. Nr. 1, Tabelle 7; $27.8 \text{ n Mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Als Beg et al. (103) ähnliche und ausführlichere Ergebnisse publizierten, wurden diese Untersuchungen abgebrochen. Jedoch steht der Beweis, daß die chemische Modifikation durch Phosphorylierung zustande kommt noch aus. ^{32}P -Einbaustudien mit $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ATP in gereinigte HMG-CoA-Reduktase müßten Klarheit verschaffen.

Tabelle 7. HMG-CoA-Reduktase Aktivität in Mikrosomen nach Vorinkubation des 10^4 g-Überstands.

Versuch Nr.	Vorinkubation						Spezifische Aktivität [nMol·mg ⁻¹ · h ⁻¹]	% der Aktivität von Ver- such 1
	MgCl ₂ [5mM]	ATP [10mM]	PEP [16.9mM]	PK [10µg/ml]	cyclo-AMP [10µM]	Theo- phyllin [1mM]	NaF [5mM]	
1	-	-	-	-	-	-	-	100
2	+	+	+	+	+	+	+	17
3	+	+	+	+	+	+	-	44
4	+	+	+	+	+	-	+	17
5	+	+	+	+	-	+	+	17
6	+	+	+	+	-	-	-	44
7	+	-	+	+	+	+	+	103

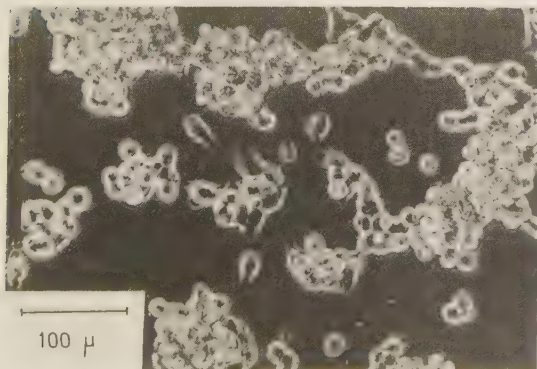
Die 10^4 -g-Überstände wurden 1 h bei 37° vorinkubiert. Nähere Einzelheiten siehe Text und Exptl. Teil S. 73. Alle angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

IV. UNTERSUCHUNG DER HMG-CoA-REDUKTASE-AKTIVITÄT IN HEPATOMAZELLEN.

Die im vorigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß eine Reihe von Hormonen die Aktivität der hepatischen HMG-CoA-Reduktase beeinflussen können. Die Unterscheidung zwischen einem direkten Einfluß dieser Hormone in der Leber und einem indirekten Einfluß durch Veränderung anderer Größen, die dann ihrerseits die Aktivität des Enzyms beeinflusst hätten, war nicht oder nur begrenzt möglich. Wir entschlossen uns deshalb, die Untersuchungen über die hormonelle Beeinflussbarkeit der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität an kultivierten Hepatomazellen fortzusetzen.

1. HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Hepatomazellen.

Kürzlich berichtete Watson (104) über den hemmenden Einfluß von Lipoproteinen auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Kulturen von Hepatomazellen, die Publikation enthielt jedoch keine Angaben über die Absolutspiegel der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von Hepatomazellen. Vorversuche ergaben, daß Hepatomazellen von Kulturen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, niedrige HMG-CoA-Reduktase-Aktivitäten besaßen, unabhängig davon, ob die Zellen zuvor in serumhaltigem Medium (cholesterolphaltig) oder 16 h lang in serumfreiem Medium gehalten worden waren. Aus Fig. 22 ist zu entnehmen, daß zwischen Aktivität des Enzyms und eingesetztem mikrosomalem Protein eine lineare Abhängigkeit besteht.



Kultur von
Hepatomazellen

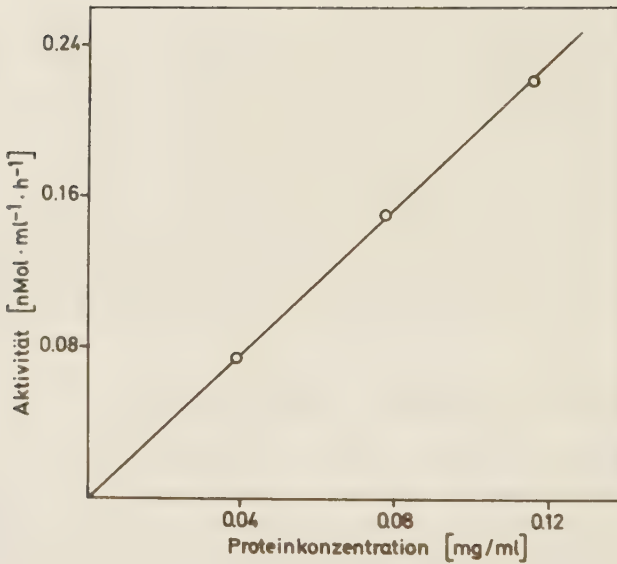


Fig. 22. Beziehung zwischen Konzentration mikrosomalen Proteins und Aktivität der HMG-CoA-Reduktase von Hepatomazellen.

2. Einfluß von Insulin:

Im Hinblick auf die Wirkung des Insulin in lebenden Ratten sollte untersucht werden, ob die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität auch in Hepatomazellen durch Insulin stimuliert wird. Zu diesem Zweck wurden zuvor serumfrei gehaltene Kulturen von Hepatomazellen verschieden lang mit Insulin inkubiert.

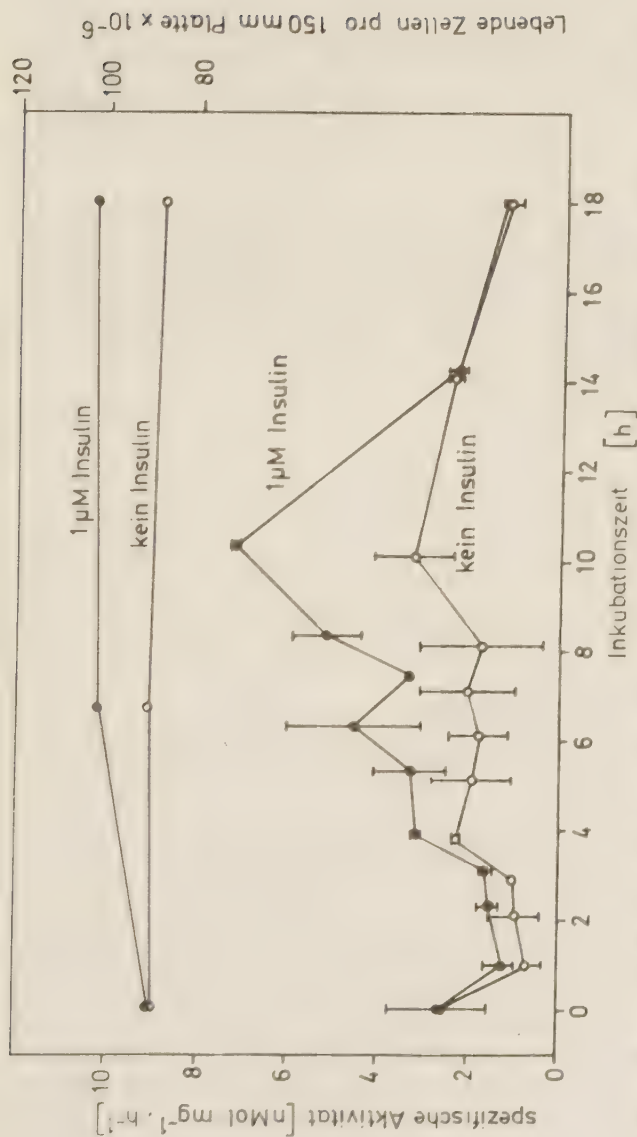


Fig. 23. Verlauf der Stimulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von Hepatoma - Zellkulturen durch Insulin. Kulturmedium: DMEM/10 % FCS. Bei 100-120 % Konfluenz wurden die Kulturen in serumfreiem Medium gehalten und 16 h später (t=0) mit frischem serumfreiem Medium (30ml DMEM) inkubiert, das entweder Insulin oder kein Insulin enthielt. Während der Inkubation wurde das Medium nicht gewechselt. Untere beiden Kurven: Spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase ($\pm$ Standardabweichung). Die Werte beider Kurven sind signifikant ($p < 0.05$) voneinander verschieden bei $t = 3, 4, 8$ und 10 h. Obere beiden Kurven: Die Zahl der lebenden Zellen wurde an jeweils einer gesonderten Platte bestimmt. Die Lebensfähigkeit war 90 % bei $t = 0$ und 95 % ± 2 bei $t = 6$ und 18 h in Kontroll- und Versuchsgruppe. Siehe Exptl. Teil S. 77.

Nach einer Verzögerungsphase von 2 - 3 h stieg die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase von Hepatomazellkulturen innerhalb von 7 h auf das 2.3 fache der Kontrollwerte an. Anschließend fielen die Werte wieder, um 16 h nach Inkubationsbeginn wieder die Kontrollwerte zu erreichen (Fig. 23, unterer Teil). Bemerkenswert ist, daß sich auch die Kontrollwerte mit der Zeit änderten. Dies läßt eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch noch unerkannte Faktoren (Veränderung des Mediums?) vermuten.

Aus der Figur ist weiterhin zu entnehmen, daß die Zahl der lebenden Zellen pro Platte und die Lebensfähigkeit bei Versuchs- und Kontrollgruppen über den Zeitraum von 18 h nahezu konstant bleibt. Aktivitätsänderungen des Enzyms durch Änderung der Zelldichte sind dadurch ausgeschlossen.

Zusammenfassende Diskussion.

Das Studium des Einflusses des Hell-Dunkelwechsels auf den Tag- und Nachtrhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität erbrachte den Nachweis, daß der Enzymrhythmus durch periodische Signale endogenen Ursprungs erzeugt wird. Dieser Befund legte die Möglichkeit einer hormonellen Steuerung des Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nahe (S. 23).

Eine erste Eingrenzung der an der Regulation der Enzymaktivität beteiligten Hormone gelang durch Untersuchungen an ganglionektomierten, hypophysektomierten und adrenalektomierten Ratten. Da weder Ganglionektomie noch Adrenalektomie den Reduktaserhythmus beeinflussen, scheiden Melatonin und Serotonin, sowie die Corticosteroide der Nebennierenrinde und die Catecholamine des Nebennierenmarks als positive Regulatoren des Enzymrhythmus aus.

Dagegen zeigt die Beseitigung des Reduktaserhythmus in hypophys-ektomierten Ratten, daß die Hypophyse an der Steuerung des Rhythmus beteiligt ist; die während einer 24h-Periode einheitlich niedrigen Reduktaseaktivitäten dieser Tiere könnte durch den Mangel eines stimulierenden Faktors oder durch Anwesenheit eines hemmenden Faktors bedingt sein. Die Entfernung der Hypophyse entzieht dem Kreislauf die tropen Hormone, die die Sekretion anderer Hormone auslösen. Als möglicher regulatorischer Faktor scheidet ACTH aus, da der Enzymrhythmus in adrenalektomierten Ratten persistiert und da bislang ein direkter Effekt des ACTH auf die Leber nicht nachgewiesen werden konnte (105). Unser Interesse galt deshalb einem anderen tropen Hormon der Hypophyse, TSH, das die Produktion und Absonderung der Thyroidhormone verursacht. Von den Thyroidhormonen war bekannt, daß sie sowohl die Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese (17, 20, 21) als auch die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase (32, 33) stimulieren. Da Trijodthyronin die niedrigen Reduktaseaktivitäten von hypophysektomierten Ratten erheblich steigert, könnte in diesen Tieren das TSH der einzige fehlende Faktor sein, der auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität einen stimulierenden Einfluß ausübt. D.h., hypophysektomierte Ratten benötigen für hohe Reduktaseaktivitäten die Thyroidhormone oder das TSH.

Unklar geblieben ist der Einfluß des Wachstumshormons auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, die nach wiederholter Verabreichung eines Wachstumshormonpräparats gefundene Steigerung der Enzymaktivität könnte dem Wachstumshormon selbst, aber ebenso gut dem TSH-Gehalt des Präparats zugeschrieben werden. Bedenkt man, daß die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase vom Alter und damit von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängt (30), erscheint eine synergistische Wirkung von Wachstumshormon und Thyroidhormon möglich.

Der Aktivitätsverlust der HMG-CoA-Reduktase in Alloxan-diabetischen Ratten deutet auf die Beteiligung des Insulins an der Regulation der Enzymaktivität hin. Der durch Injektion von Insulin in Alloxan-diabetische und normale Ratten verursachte, schnelle und kurzdauernde Anstieg der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, legt den Schluß nahe, daß der Aktivitätsspiegel des Enzyms in Ratten durch die Menge des von den pankreatischen β -Zellen abgesonderten Insulins mitbestimmt wird. Diese Auffassung wird durch die Parallellität der tageszeitlichen Rhythmen von HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und Plasmainsulin-Spiegel (83) gestützt.

Somit ist die Anwesenheit von Thyroidhormonen in hypophysektomierten Ratten und die Anwesenheit von Insulin in Alloxan-diabetischen Ratten eine notwendige Bedingung für hohe Reduktaseaktivitäten. Im Gegensatz zu Trijodthyronin kann exogenes Insulin in hypophysektomierten Ratten (in denen ohnehin endogenes Insulin vorhanden ist) die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase nicht anheben. Das bedeutet, daß zur Stimulierung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität durch Insulin mindestens ein weiterer Faktor benötigt wird. Da die Injektion von Trijodthyronin hohe Aktivitätsspiegel in hypophysektomierten Ratten erzeugt, ist Thyroidhormon ein wichtiger Faktor für Insulin, seinen stimulierenden Einfluß auszuüben. Auf der anderen Seite sind Thyroidhormone in Alloxan-diabetischen Ratten vorhanden. Trotzdem werden nur niedrige Reduktaseaktivitäten gefunden. Das bedeutet, daß für hohe Reduktaseaktivitäten in der euthyreoten Ratte (32, 33) Insulin (oder ein Insulin-abhängiger Faktor) benötigt wird. Man sollte deshalb erwarten, daß die Injektion von Trijodthyronin in Alloxan-diabetische Ratten die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nicht stimuliert. Unser Versuch zeigte aber, daß Trijodthyronin die Aktivität der HMG-

CoA-Reduktase in diabetischen Tieren beträchtlich steigerte. Das könnte mit noch vorhandenen geringen Insulinmengen (S. 46) erklärt werden, die zwar die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität limitieren, jedoch für die Stimulation durch Trijodthyronin noch ausreichen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß Trijodthyronin sogar in Abwesenheit von Insulin stimuliert; Voraussetzung dafür wäre aber, daß der Thyroidhormonspiegel in Alloxan-diabetischen Tieren für die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität limitierend ist. Es scheint daher möglich, daß die Thyroidhormone auch bei Abwesenheit von Insulin hohe Reduktaseaktivitäten zur Folge haben.

Somit werden mindestens 2 Hormontypen, Thyroidhormone (und damit TSH und dessen hypothalamischer "releasing-factor") sowie Insulin für hohe Reduktaseaktivitäten in hypophysektomierten bzw. Alloxan-diabetischen Tieren benötigt. Theoretisch könnten zusätzliche hormonelle Faktoren unentbehrlich sein. Unsere Experimente zeigten jedoch, daß deren Verfügbarkeit nicht von der Anwesenheit der Hypophyse oder der pankreatischen β -Zellen abhängen würde. Dies schließt alle Steroidhormone und solche Hormone aus, die von diesen abhängen.

Von den verbleibenden Hormonen lösen Glucagon und Prostaglandin E_1 die Bildung von cyclo-AMP in der Leber aus. Unsere Versuche zeigten, daß unter Bedingungen, die eine Phosphorylierung von Proteinen ermöglichen, die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität erniedrigt wird, und dieser Effekt durch die Anwesenheit von Fluoridionen noch beträchtlich verstärkt wird. Es ist bekannt, daß Fluoridionen in partikulären Präparationen der Leber über die Aktivierung der Adenylcyclase den Spiegel von cyclo-AMP erhöhen (106). Dieses Nucleotid (103) und sein Dibutyrylderivat (27,99) verursachen raschen Abfall der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (99, 103) bzw. der Geschwindigkeit der Cholesterolsynthese (27) in vivo (27, 99) oder in vitro (103). Daher wird von Hormonen, die cyclo-AMP als "second messenger" benützen, inhibitorische Funktion in der Regulation der Cholesterolsynthese erwartet. Da somit Glucagon und Prostaglandin E_1 als direkt auf die Leber wirkende positive Regulatoren der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität ausscheiden, bleiben wahrscheinlich Thyroidhormone und Insulin als unentbehrliche Faktoren für hohe Reduktaseaktivitäten übrig. Der paradoxe Effekt, daß Glucagon

ein Antagonist des Insulins, ebenso wie Insulin einen Anstieg der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität verursacht, kann durch die insulinotrope Wirkung des Glukagons auf die pankreatischen β -Zellen (107) erklärt werden. Diese Wirkung des Glukagons ist nur von kurzer Dauer. Ihr folgt eine Senkung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität. Über die Ursachen dieses Absinkens läßt sich derzeit nur spekulieren. Angesichts der in unseren Versuchen gefundenen biphasischen Wirkung des Glukagons, ist es nicht überraschend, daß Lakshmanan et al. (102) 4 h nach Glukagoninjektion keine Stimulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität beobachtet haben.

Einen ersten Hinweis, daß es sich bei dem stimulierenden Einfluß von Insulin auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität um einen direkten Effekt auf die Leber handelt, erhielten wir aus Untersuchungen über den Insulineinfluß in Kulturen von Hepatomazellen. Sollte sich herausstellen, daß der Insulineffekt in der Leber über cyclo-GMP vermittelt wird, würde man erwarten, daß die Hormone, die dieses Nucleotid als "second messenger" benutzen, Insulin dann ersetzen können, wenn die Leber die entsprechenden Rezeptoren besitzt.

Mit Nachdruck sei betont, daß ein Hormon, das sich nach obiger Betrachtung nicht an der positiven Regulation der Cholesterolsynthese beteiligt, die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität inhibitorisch regulieren könnte. Wie kürzlich berichtet wurde, bewirkt die Injektion von Dexamethason, einem Analogen des Corticosterons, in normalen Ratten eine Senkung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (99). Allerdings erscheint der Schluß voreilig, Corticosteroide besäßen inhibitorische Funktion bei der Regulation des Rhythmus der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, da der Rhythmus in adrenalektomierten Ratten persistiert.

Zu den hemmenden Faktoren gehören auch nicht-hormonelle Verbindungen wie Cholesterol (29) und Gallensäuren (30), die die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase senken. Daher ist die Anwesenheit von Thyroidhormon und/oder Insulin eine notwendige jedoch keine ausreichende Bedingung für hohe Reduktaseaktivitäten. Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität der Reduktase zu beeinflussen, besitzen Hormone, welche die Spiegel von Thyroidhormonen und Insulin erhö-

hen.

In Ausweitung dieser Betrachtungen ist man versucht vorauszusagen, daß Fütterung des Gallensäuren bindenden Anionenaustauschers Cholestyramin nur dann hohe Reduktaseaktivitäten (75) verursachen wird, wenn Thyroidhormone und/oder Insulin anwesend sind.

Die lange Verzögerungsphase zwischen Verabreichung von Trijodthyronin und Aktivitätsanstieg des Enzyms deutet eine Hormonwirkung auf Transkriptions-und/oder Translationsebene an. Obwohl die Wirkung des Insulins viel rascher einsetzt (101, 102; S. 42) als die der Thyroidhormone (32, 33), könnte es ebenfalls auf derselben Ebene wie Thyroidhormone wirken. Angesichts der antagonistischen Wirkungen von cyclo-AMP und Insulin ("second messenger" für letzteres ist wahrscheinlich cyclo-GMP) (108), erscheint auch eine Beteiligung des Insulins bei der Interkonversion der HMG-CoA-Reduktase attraktiv. Genauer gesagt, würde das wahrscheinlich bedeuten: Übergang der phosphorylierten (inaktiven) in die unphosphorylierte (aktive) Form des Enzyms in Gegenwart von Insulin.

Schließlich sei auf die Möglichkeit einer neuralen Beeinflussung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität hingewiesen. Sie kann indirekt (z.B. über die Modulation der Sekretion des TSH-releasing-factors) oder direkt über die neurohormonalen Transmitter des autonomen Nervensystems geschehen. Shimazu et al. (109) zeigten, daß Stimulation des die Leber innervierenden sympathischen Nervus splanchnicus die Aktivität der hepatischen Glykogenphosphorylase rasch ansteigen ließ; dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Stimulierung der Vagusnerven (parasympathisch) vollständig verhindert (109). Noradrenalin, bekannt als sympathischer Überträgerstoff (110), steigert den cyclo-AMP-Spiegel in der Leber (111). Hingegen erhöht der parasympathische Überträgerstoff Acetylcholin den cyclo-GMP-Spiegel, wie Untersuchungen am perfundierten Rattenherz ergaben (112). Eine nervöse Kontrolle der HMG-CoA-Reduktase könnte also über Vermittlung dieser beiden Nucleotide zustandekommen. Dies würde bedeuten: Inaktivierung des Enzyms durch adrener-gische, Aktivierung durch cholinergische Neurotransmission.

Die Untersuchungen über die hormonelle Beeinflussung der HMG-CoA-

Reduktase-Aktivität durch Thyroidhormon, Corticosteron und Glukagon sollen an geeigneten Modellsystemen (Hepatoma-Zellkultur, Primärzellkultur bzw. Leberschnittverfahren) fortgesetzt werden. Der stimulierende Einfluß des Insulins auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Zellkulturen und gegebenenfalls der Einfluß der anderen benannten Hormone und der beiden cyclischen Nucleotide bedürfen einer näheren Charakterisierung. Insbesondere ist die Wirkungsebene dieser Hormone (Transkription, Translation, HMG-CoA-Reduktase-Protein) aufzuklären. Erkenntnisse, die aus Untersuchungen an diesen Modellsystemen in vitro erhalten werden, bedürfen der Überprüfung auf physiologische Bedeutung im Tierversuch. Ziel weiterer Untersuchungen ist, auch die Wirkungsebenen sämtlicher nicht hormoneller Faktoren (Nerven, Cholesterol, Gallensäuren, Hunger) in Bezug auf die Regulation der Cholesterolsynthese kennenzulernen. Mit diesen Kenntnissen ausgerüstet, könnte man den Einfluss der einzelnen Faktoren auf den Stoffwechsel des Cholesterols bei normalen und pathologischen Zuständen des Organismus abschätzen.

Experimenteller Teil.

1. Geräte.

allgemein:

Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer, Model 3380 plus
AAA Computer, Model 544 (Packard, Frankfurt/M.).

Radiogaschromatographie-Einheit:

Gaschromatograph Aerograph 1700 (Varian, Aerograph GmbH.,
Darmstadt),
Tricarbverbrennungsofen, Model 325, Tricarb Szintillations-
detektor mit Einkanal-Szintillationsdetektor Model 3101,
Einkanal-Ratemeter Model 280 A (Packard Instr., Frankfurt/M.)
2 Kompensationslinienschreiber, Typ 414 T, Meßbereich 0-1mV
(Honeywell, Frankfurt/M.)

Photometer Eppendorf (Netheler und Hinz, Hamburg)

Spektralphotometer Zeiss, Modell M 4 Q II

Präparative Ultrazentrifuge, Model L (Spinco-Beckmann)

Automatic Superspeed Centrifuge, RC-2, Sorvall

Tischzentrifuge, Superspeed Junior (Christ)

Ultraschall-Aufschlußgerät, Model S 75 (Branson Instr. Inc.,
Danbury/Connecticut)

pH-Meter, Modell E 532 (Methrom, Schweiz)

großer Homogenisator (Eigenbau Moosbauer)

Spincobecher 3/16 x 1 5/8 Zoll (Spinco-Beckmann),

dazu Adaptoren aus Polyamid (Eigenbau Zentralwerkstätte Martins-
ried)

Sorvallbecher, Polycarbonat, 3.5 ml (10.9 x 77.2mm) Kat.Nr.270

dazu Gummiadaptoren (Fa. Hormuth u. Vetter, Heidelberg).

Säulentrichter, Plastik, verwendet von disposable plastic columns (Chromaflex column) (Kontes Glass Co., Vineland, New Jersey).

Mikroliterspritzen, 5, 10, 15, 20 und 50µl (Hamilton, Hamburg)

Tischrechner, Sony, Sobax 2550 und Canon Canola L 121

Zellkultur:

Edgegard Hood (steriler Arbeitsplatz) (The Baker Co., Inc., Sanford, Maine)

CO₂-Inkubator, Model 329 (Forma Scientific, Marietta, Ohio)

Flüssigstickstoff-Kühltruhe, Minnesota Valley Engineering (MVE)-Model (Cryo-Associates, Washington D.C.)

Zelleinfriergerät, Union Carbide Model BF-4 (Messer, Griesheim)

Filtrationsgerät zum Sterilisieren von Medium (Millipore-Filter) GmbH., Neu-Isenburg)

dazu Schlauchpumpe, Masterflex mit variabler Geschwindigkeit (Cole-Parmer Instr., Co., Chicago)

Touch-O-matic Bunsenbrenner (Hanau Engineering Buffalo, New York über LS Labor Service, München)

Pipetter, Piggyback PB 10 (Scientific Industr. Inc., Queens Village 29/New York)

Plastik-Petrischalen, Ø 150 mm und Plastik-Gewebekulturflaschen, 75cm², (Falcon Plastics: LS Labor Service, München; Greiner Plastik: Boll, München)

Sterilfilter aus Plastik, Nalgene Filter Units No. 120 (Metro Scientific, Farmingdale, New York)

Medienflaschen, 1 l und 100 ml, Sovirel (Bender u. Hobein, München)

Invertmikroskop (Phasenkontrast) und Mikroskop (C. Zeiss, München)

Hämocytometer (Arthur Thomas Co., Philadelphia, Pennsylvania)

Homogenisator, Glasbehälter (0.5ml), Teflonplümpfer Größe 18, Nr. K 886 000 (Kontes Glass Co., Vineland, New Jersey)

2. Substanzen

Natrium [^{14}C] Bicarbonat (wässrige Lösung), spezifische Radioaktivität 56.9mC/mMol, [$1\text{-}^{14}\text{C}$] Hexadecan, spez. Rad. 1.06 $\mu\text{C/g}$, [$2\text{-}^3\text{H}$] DL-Mevalonolacton, spez. Rad. 87 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ (Radiochemical Center, Amersham, England)

[$3\text{-}^{14}\text{C}$] 3-Hydroxy-3-methylglutarat, spez. Rad. 3.2 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$; [$2\text{-}^{14}\text{C}$] DL-Mevalonat Dibenzyläthylendiammoniumsalz, spez. Rad. 12.7 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ (NEN, Dreieichenhain, Frankfurt/M.)

Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphatdehydrogenase und NADP (Boehringer, Mannheim GmbH.)

Ionenaustauscherharz Biorad AG 1-X8, $\text{Cl}^{\ominus}$ -form, 100-200 mesh (Biorad Laboratories, Richmond, California)

Instagel (Packard, Frankfurt/M.)

Insolve (Koch-Light Laboratories, Colnbrock, England)

Alloxantetrahydrat (Merck, Darmstadt)

Depot-Insulin vom Rind (Farbwerke Hoechst, München)

Insulin, kristallin vom Schwein (The Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana, 46206, U.S.A.)

3,5,3'-Trijodthyronin (Sigma, Chemical Company, St.Louis, Missouri)

Wachstumshormon ("Crescormon") vom Mensch (Deutsche Kabi GmbH, München)

Pulvermedien (Schwarz/Mann, Orangeburg, New York)

Fötales Kälberserum (Gibco, über Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

Trypsin, pro analysi, lyophilisiert (Boehringer/Mannheim)

Nigrosin (Eastman Organic Chemicals)

Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt)

3-Methyl-Crotonyl-CoA wurde nach Knappe et al. (113) synthetisiert, jedoch wurde die Acylierung statt bei 0° bei ZT ausgeführt, wodurch die Ausbeute des Präparats auf 54 % erhöht werden konnte.

3-Methyl-Crotonyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* IV S stellte mir Herr Dr. Schiele, 3-Methyl-Glutaconyl-CoA-Hydratase aus *Achromobacter* IV S Herr E. von Stetten freundlicherweise zur Verfügung.

[5- 14 C]HMG-CoA wurde nach (72) synthetisiert.

3. [5- 14 C]HMG-CoA Lösung.

Im Verlauf der Arbeit wurden 3 Präparate von [5- 14 C]HMG-CoA synthetisiert und analysiert. Z.B. wurde die Konzentration (72, 114) eines der Präparate zu $1.57 \mu\text{Mol/ml}$ bestimmt (Fig. 24).

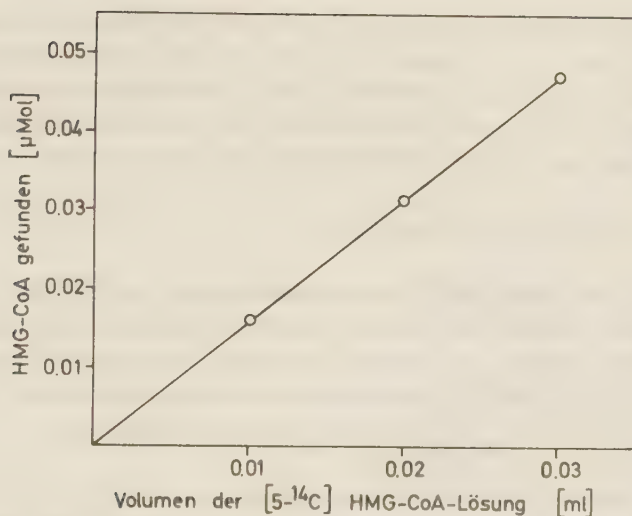


Fig. 24. Abhängigkeit der gefundenen HMG-CoA-Menge vom Volumen der eingesetzten HMG-CoA-Lösung.

Die Bestimmung der Gesamtradioaktivität nach (72) ergab 59.0 $\mu\text{C}/\text{ml}$, der Anteil des $[5-^{14}\text{C}]$ Methyl-Glutaconyl-CoA von der Gesamtradioaktivität wurde nach (72) zu 16.8 % bestimmt. Die $[5-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA-Radioaktivität betrug 49.1 $\mu\text{C}/\text{ml}$ und die spezifische Radioaktivität 31.3 $\mu\text{l}/\mu\text{Mol}$ bzw. $6.95 \cdot 10^7 \text{ dpm}/\mu\text{Mol}$. Ein anderes Präparat besaß eine spezifische Radioaktivität von $8.1 \times 10^7 \text{ dpm}/\mu\text{Mol}$.

4. Proteinbestimmung.

Die Proteinbestimmung von Mikrosomen aus Rattenlebern wurde nach der Biuretmethode (115) ausgeführt, während bei niedrigen Proteingehalten (Mikrosomen von Hepatomazellen) vorwiegend die Methode von Lowry et al. (116) verwendet wurde; als Standard für die Proteinbestimmungen wurde Serumalbumin vom Rind verwendet.

5. Ratten, Käfige und Standarddiät.

Sämtliche Ratten waren männliche Sprague-Dawley Ratten und stammten vorwiegend von der Fa. Wiga, Sulzfeld, Königshofen (vormals Ottobrunn bei München). Lediglich hypophysektomierte und scheinhypophysektomierte Ratten gleichen Stammes und Geschlechts wurden von den Charles-River Breeding Laboratories, Wilmington, Massachusetts, U. S. A., bezogen.

Als Tierbehausung dienten Makrolonkäfige (Grundfläche: 36cm x 20 cm) oder, vor allem wenn Einzeltierhaltung notwendig war, Drahtkäfige, die sich in zwei Kompartments unterteilen ließen.

Als Tierfutter wurde ausschließlich Altromin R 1320 (vormals Altromin R 10) (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) verwendet, das bei der Fa. J. Stettner, München, erhältlich war.

6. Statistik.

Die Berechnung der Standardabweichung vom Mittelwert und der t-Werte erfolgte nach folgenden Formeln:

(Gl. 4 u. 5)

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}; \quad t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_D} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}, \text{ wobei}$$

$$S_D^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} [\sum (x_i' - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_i'' - \bar{x}_2)^2];$$

Dabei bedeuten:

S: Standardabweichung vom Mittelwert

t: Prüfgröße

$\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$: Zwei im t-Test auf Gleichheit zu prüfende arithmetische Mittelwerte.

x_i : zu $\bar{x}$ gehörige Einzelwerte

x'_1, x''_1 : zu $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ gehörige Einzelwerte

n_1, n_2 : Anzahl der Werte pro Kollektiv

Zur Ablehnung oder Annahme der Nullhypothese $[\bar{x}_1 - \bar{x}_2] = 0$

wird der t-Wert der Sicherheitsgrenzen, durch Irrtumswahrscheinlichkeit p und dem jeweiligen Freiheitsgrad ($f = n_1 + n_2 - 2$) festgelegt, mit dem berechneten t-Wert verglichen:

$t_{\text{berechnet}} > t_{\text{der Sicherheitsgrenze}}$: Ablehnung der Nullhypothese, signifikanter Unterschied

$t_{\text{berechnet}} < t_{\text{der Sicherheitsgrenze}}$: Annahme der Nullhypothese, nicht signifikanter Unterschied.

7. Zu Kapitel II (Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität).

a) Inkubation:

Die Mikrosomen von Rattenlebern und Hepatomazellen wurden nach einer früher beschriebenen Methode (72) hergestellt. Die Inkubation zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wurde nach (68, 72) ausgeführt. Lediglich die Cystein-Konzentration wurde zu 100mM gewählt; unter dieser Testbedingung ist die Cystein-Aktivierung der HMG-CoA-Reduktase maximal (117) (Fig. 25).

Die Inkubationsmischung enthielt: 100mM Tris · HCl-Puffer, pH 7.2; 20 mM K-EDTA, pH 7.2; 10mM Glucose-6-phosphat, pH 7.2; 65.2 μ M S-[5- 14 C] HMG-CoA; 10 μ g/ml Glucose-6-phosphatdehydrogenase (350 U/mg); 100 mM Cysteinhydrochlorid, neutralisiert; wechselnde Mengen mikrosomalen Proteins. Das Volumen wurde mit Homogenisationspuffer (68) ad 0.200 ml gebracht. Inkubiert wurde 1 h bei 37° in Eppendorfgefäßen. Für die Aktivitätsbestimmung von Mikrosomen hoher spezifischer HMG-CoA-Reduktase-Aktivität ist die Verdünnung des [5- 14 C]HMG-CoA-Präparats mit unmarkiertem R,S-HMG-CoA (z.B. 1:2) aus Sparsamkeitsgründen ratsam.

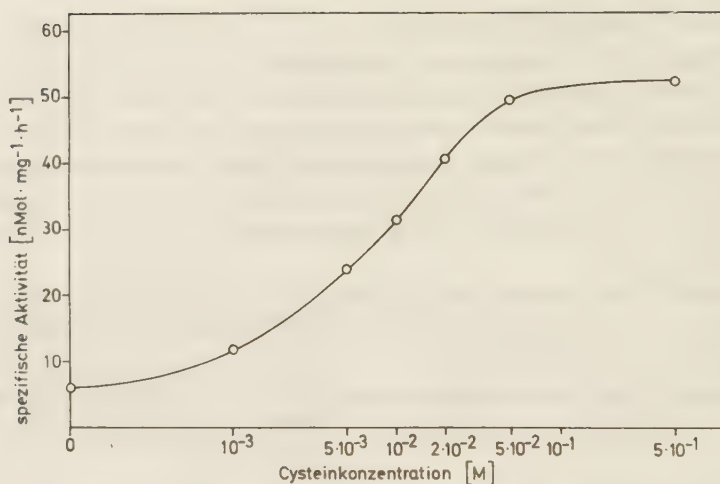


Fig. 25. SH-Aktivierung der HMG-CoA-Reduktase.

b) Extraktion von Mevalonolacton:

Am Ende der Inkubation werden 300µl einer Lösung zugegeben, die 5µMol R,S - [5-³H] Mevalonat (60000 dpm) enthielt, die Reaktion durch Abkühlen in einer Trockeneis-Methanol-Mischung und anschließende Zugabe von 0.1 ml 2N H₂SO₄ beendet. Zur Bildung des Lactons (55) wird 10 min bei ZT stehengelassen. Dann werden die Inhalte der Plastikgefäße durch kurze Zentrifugation in Zentrifugenröhrchen (96x16mm) überführt und mit 6g wasserfreiem Na₂SO₄ verrührt. Nach 1 stündigem Stehen bei ZT werden die Proben 4 mal mit Äther (1x4.5ml, 3x2.5ml) extrahiert. Wenn nötig, kann die Periode des Stehens mit Na₂SO₄ ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse auf mehrere Wochen ausgedehnt werden.

Die vereinigten Extrakte werden im Wasserbad bei 37° unter warmem Luftstrom eingedampft. Der Rückstand wird in 0.5ml H₂O gelöst.

c) Chromatographie:

Das Anionenaustauscherharz (Biorad AG. 1-X8, Cl^- -form, 100-200 mesh) wird ausgiebig erst mit Äthanol, dann mit H_2O gewaschen und unter H_2O bei 4°C aufbewahrt. In Pasteurpipetten (23 cm lang, innerer Durchmesser 5.5mm), die am unteren Ende mit einer Glaskugel (3mm Durchmesser) verschlossen sind, wird das Harz bis zu einer Füllhöhe von genau 8.0cm (s.u.) eingeschlämmt. Das obere Ende der Säule wird mit einem kleinen Plastiktrichter (Höhe 5cm), hergestellt aus dem oberen Teil einer Plastiksäule (Chromaflex column, Kontes), dicht verbunden. Die Säule wird nun mit einigen ml H_2O nachgewaschen. Dann wird ein Aliquot der wässrigen Lösung der Ätherextrakte (z.B. 0.4ml) auf die Säule aufgetragen. Die Säule wird mit soviel H_2O nachgespült, daß das Volumen des Eluats 5ml beträgt. Das Eluat wird in Plastikgefäßen aufgefangen und mit 10ml einer Szintillationslösung (Instagel oder Unisolve) vermischt. Die ^3H - und ^{14}C -Radioaktivitäten [dpm] werden simultan mit einem Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer bestimmt, das mit einem Computer ausgerüstet ist.

d) Trennungseigenschaften des Anionenaustauscherharzes in Abhängigkeit von der Füllhöhe.

Um den Einfluß der Füllhöhe des Harzbettes auf die Elution von MVL und HMG kennenzulernen, wurden Testmischungen verwendet, die den HMG-CoA-Reduktase-Test annähernd simulierten. Die Testmischung bestand aus einer Vormischung (100mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.2; 50mM Cysteinhydrochlorid neutralisiert; 10mM 3-Phosphoglycerat, neutralisiert; 20mM Na-EDTA, das Volumen wurde mit Homogenisationspuffer (68) auf 0.200ml gebracht) und [^{14}C]MVA oder [^{14}C]HMG. Das Volumen wurde dann mit H_2O auf 0.500ml aufgefüllt. Die Proben wurden 10 min mit 80µl 1N HCl bei ZT inkubiert und mit 120µl Malatpuffer, pH 6.5 versetzt; Chromatographie: Biorad 1-X8, Cl^- -form, 100-200mesh.

Variation der Füllhöhe des Harzbettes und Elution von [^{14}C]MVL:

[^{14}C]MVA-haltige Proben (z.B. 80 000 Ipm) wurden auf Säulen von 2-10 cm Länge aufgesetzt und mit steigenden Mengen H_2O eluiert.

100 % Ausbeute wurden einer Kontrollprobe zugeschrieben, der im gleichen Maß H_2O zugesetzt wurde und die ohne Chromatographie direkt in ein Szintillationsgefäß gegeben wurde. Fig. 26 zeigt, daß bei der 8 cm Säule mit 5 ml H_2O nahezu 88 % der Radioaktivität (^{14}C]MVL) wiedergewonnen werden konnten.

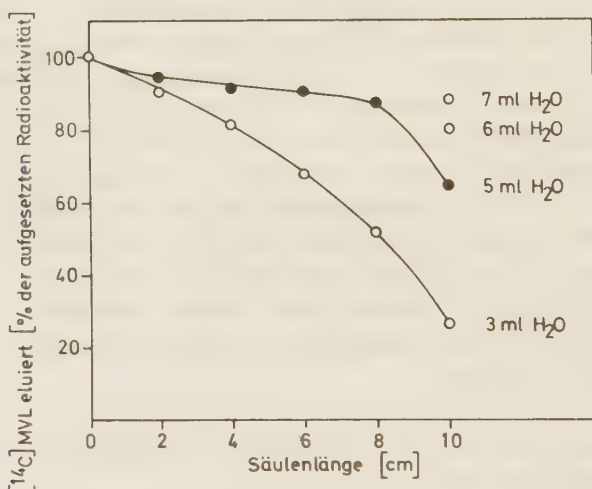


Fig. 26. Abhängigkeit der Elution von ^{14}C]MVL von der Füllhöhe des Harzbettes bei verschiedenen Elutionsvolumina.

Nur bei der 10cm Säule wurde bis zu 7 ml eluiert. Alle anderen Säulen (2-8cm) wurden nur mit 3ml (0.7ml ^{14}C]MVL-Lösung + 2.3ml H_2O) und dann weiteren 2 ml H_2O eluiert.

Variation der Füllhöhe des Harzbettes und Elution von ^{14}C]HMG:

In ähnlicher Weise wie zuvor im Versuch über die Elution von ^{14}C]MVL beschrieben, wurden ^{14}C]HMG-haltige Proben (z.B. 300 000 Ipm) behandelt. Die 10 cm Säule läßt bei höheren Elutionsvolumina (6 und 7 ml) bereits einen großen Anteil des ^{14}C]HMG durch (Fig. 27). Da die Elution mit 5 ml H_2O einer 10 cm- und einer 8 cm - Säule keinen nennenswerten Unterschied in der Menge des eluierten ^{14}C]

HMG zeigen (Fig. 27), wurde die 8cm-Säule als die beste Lösung angesehen.

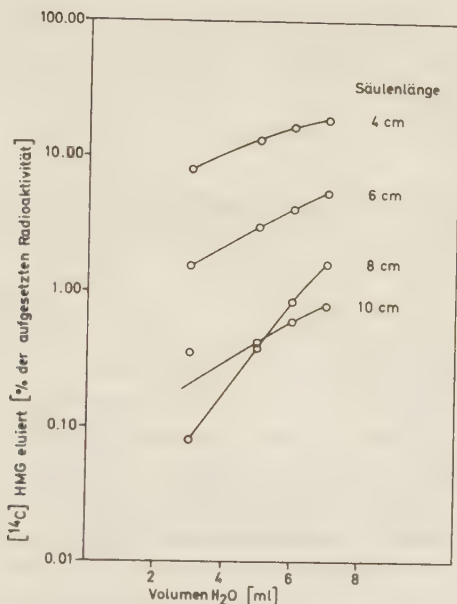


Fig. 27. Abhängigkeit der Elution von $[^{14}\text{C}]$ HMG vom Elutionsvolumen bei verschiedenen Füllhöhen.

e) Enzym-Simulationsversuch.

Hierzu wurden Standard-Inkubationsgemische (S. 65) mit steigenden Mengen $[^{14}\text{C}]$ MVA und einer konstanten Menge $[^3\text{H}]$ MVA als radioaktivem Träger (5 μMol ; 50 000 dpm) 1 h bei 37° inkubiert. Nach anschließender Inkubation mit 80 μl 1 N HCl (10 Min, ZT) wurde mit Na_2SO_4 verrührt und MVL mit Äther extrahiert. Ein Aliquot der wässrigen Lösung der trockenen Ätherextrakte wurde auf eine Biorad-Säule (Cl^- -form, 100-200 mesh; 8 cm Füllhöhe) gegeben und mit H_2O ad 5ml Gesamtvolumen eluiert. Als Kontrolle für die $[^{14}\text{C}]$ HMG-Durchlässigkeit diente eine Probe, die alle Ingredientien außer $[^{14}\text{C}]$ MVA enthielt und in gleicher Weise weiterverarbeitet wurde wie die anderen Proben. Die nach Leerwert und Ausbeutekorrektur (siehe S. 9) erhaltenen ^{14}C -dpm, die ^{14}C -MVL entsprechen, über der Menge

der eingesetzten $[^{14}\text{C}]\text{MVA}$ Lösung aufgetragen, ergeben - abgesehen vom ersten Punkt - eine Ursprungsgerade (Fig. 28).

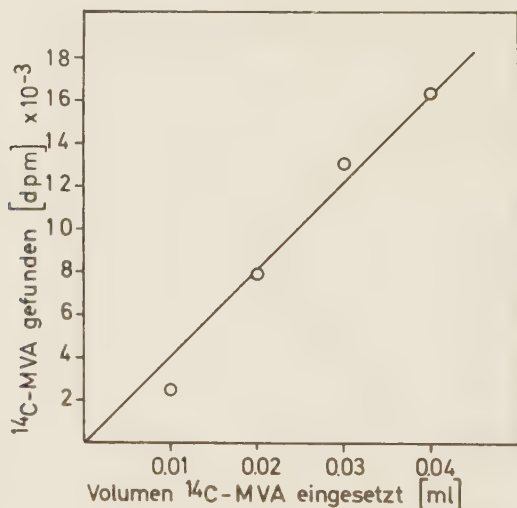


Fig. 28. Beziehung zwischen der nach Säulenchromatographie gefundenen dpm ^{14}C -MVL von der in den Test eingesetzten Menge ^{14}C -MVA.

Die Gesamtausbeute an $[^{14}\text{C}]\text{MVL}$ betrug ca. 64 %; der Leerwert war 0.13 % der in den Test eingesetzten Radioaktivität des $[^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA}$ Präparats ($1.27 \cdot 10^6$ dpm pro Inkubation). Die Radioaktivität der $[^{14}\text{C}]\text{MVA}$ Lösung betrug $4.46 \cdot 10^5$ dpm/ml.

f) Angaben zu einzelnen Versuchen.

Zu Fig. 2, S. 11: Die Inkubation zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wurde unter Standardbedingungen ausgeführt (Exptl. Teil S. 65) (72). Die Zählausbeuten für doppelmarkierte Proben waren: 40 % für ^{14}C im ^{14}C -Kanal, 13 % für ^{14}C im ^3H -Kanal. Jede Probe wurde 3 mal 10 min lang gezählt. Griff man den letzten Punkt der Kurve II als Beispiel heraus, so fand man folgende Mittelwerte: 20 180 Ipm für ^{14}C im ^{14}C -Kanal, 6560 Ipm für ^{14}C und

4 870 Ipm für ^3H im ^3H -Kanal. Die Standardabweichung der durchschnittlichen dpm-Werte, die sich aus obigen Daten ergaben, war $\pm 2\%$. Die Gesamtausbeuten an Mevalonat (Kurve II) variierten zwischen 50 und 60 %. Die spezifische Radioaktivität des im Enzymtest eingesetzten [$5\text{-}^{14}\text{C}$] HMG-CoA war 8.1×10^7 dpm/ μMol . Die untere Meßgrenze des Anionenaustauscherverfahrens liegt bei $75 \text{ pMol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.

8. Zu Kapitel III (Untersuchungen über die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase der Rattenleber)

a) Tierhaltung:

Nach Erhalt vom Lieferanten wurden Gruppen von 4 - 6 Ratten pro Käfig mindestens 5 Tage bei 23°C in einem Raum mit künstlicher Beleuchtung (weißes Neonlicht, L: 7^{h} - 19^{h} , D: 19^{h} - 7^{h} , "normaler" Beleuchtungsrhythmus) gehalten, um sie an die neue Umgebung zu gewöhnen. Wenn nichts anderes angegeben, wurden den Ratten Futter und Leitungswasser ad libitum gewährt. Die Tiere wurden durch Enthaupten getötet. Anschließend wurden sofort die Lebern entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung in eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung gelagert. Alle Uhrzeiten sind in mitteleuropäischer Zeit angegeben.

b) Umkehrung des Beleuchtungsrhythmus:

Die Umkehrung des Beleuchtungsrhythmus (Phasensprung um π , d.h. 12 h) wurde immer nach einer vollständigen Hellperiode vorgenommen (L: 19^{h} - 7^{h} ; D: 7^{h} - 19^{h}). Die Tiere wogen zum Zeitpunkt des Tötens 90-130 g.

c) Dauerlicht und Dauerdunkel:

Nach mindestens 7 tägiger Gewöhnung an einen normalen Beleuchtungsrhythmus (L: 7^{h} - 19^{h} , D: 19^{h} - 7^{h}) wurden die Ratten entweder im Dauerlicht oder im Dauerdunkel (ebenso nach Blendung) gehalten. Äthernarkotisierte Tiere wurden durch Entfernung der beiden Augäpfel geblendet. Alle Tiere, mit Ausnahme der geblendeten, nahmen in der gewohnten Weise an Gewicht zu (5.9 bis 7.3g/24h). Die geblendeten Ratten nahmen während der ersten beiden postoperativen Tage zunächst ab, erholten sich wieder und nahmen bis zum Zeitpunkt des Tötens normal an Gewicht zu (Körpergewichte beim Töten

der Tiere: 140 - 160 g).

d) Ektomie der oberen Cervicalganglien:

Die Tiere wogen bei der Operation 80-120g. Die Ganglionektomie wurde nach (118, 119) ausgeführt. Zur Narkose wurde Äther verwendet. Das postoperative Auftreten der Ptosis in allen ganglionektomierten Tieren zeigte die erfolgreiche Ganglionektomie an (118). Ganglionektomierte Tiere verloren während der ersten beiden postoperativen Tage an Gewicht, erholten sich jedoch schnell wieder und nahmen bis zum Zeitpunkt des Tötens wie normale Ratten zu. Zum Zeitpunkt des Tötens betrug das Körpergewicht der Ratten 160-190 g.

e) Hypophysektomie:

Hypophysektomierte und scheinoperierte Ratten wurden aus den U. S. A. bezogen (siehe S. 64). Detaillierte Angaben über Operation und Narkose wurden - auch auf wiederholtes Anfragen hin - vom Lieferant nicht gegeben. Zum Zeitpunkt der Operation wogen die Ratten 90 - 110 g. Nach Ankunft (2-3 Tag postoperativ) wurden die Tiere adaptiert, wie zuvor unter Tierhaltung beschrieben. Futteraufnahme und Körpergewichte aller Ratten wurden mindestens einmal täglich gemessen. Kurz vor dem Töten wurde den mit Nembutal betäubten Versuchs- und Kontrolltieren mit einer 2ml Spritze 1-2ml Blut aus der Körperschlagader entnommen. Das durch Zentrifugation gewonnene Plasma wurde bis zur Corticosteronbestimmung (90, 91) eingefroren. Bei allen hypophysektomierten Ratten wurden Wachstumsstillstand und niedrige Plasmacorticosteronspiegel als Anzeichen der erfolgreichen Hypophysektomie gewertet. Dagegen deuteten Gewichtszunahme und normale Corticosteronspiegel auf Intaktheit der Hypophysen scheinoperierter Ratten.

f) Adrenalektomie:

Die Tiere wogen bei der Operation 100 - 140g. Die Adrenalektomien wurden nach Weiser (120) ausgeführt. Für die Anaesthesie wurde Äther verwendet. Die Scheinoperationen der Kontrolltiere wurden auf ähnliche Weise ohne Extirpation der Drüse ausgeführt. Der Erfolg der Adrenalektomie wurde durch Messung des Plasma-Corticosteronspiegels (90, 91) überprüft. Zu diesem Zweck wurde den mit Chloralhydrat betäubten Ratten 1-2ml Blut aus der Körperschlagader

entnommen (siehe oben Abschnitt e).

g) Alloxandiabetes:

Um 10^h wurden pro 100 g Körpergewicht 0.1ml einer Lösung Alloxan-tetrahydrat in physiologischer Kochsalzlösung (0.1mg/ml) in die Schwanzvene von über Nacht gehungerten Ratten injiziert (ca. 150g Körpergewicht). Anschliessend wurden die Ratten wieder ad libitum gefüttert. 32 und 56 h später erhielten sie subcutane Injektionen einer Depotinsulin-Lösung (4 i.u./100g Körpergewicht) (z.B. um 18^h des ersten und zweiten Tages nach Verabreichung des Alloxans). 80 h nach Verabreichung des Alloxans wurde das bei Fig. 20, S. 42 beschriebene Experiment begonnen (bzw. das bei Tabelle 6, S. 46 beschriebene Experiment, bei dem einige Tiere 32 h nach Alloxan-gabe mit Trijodthyronin behandelt wurden, bevor sie zum ersten Mal Insulin erhielten).

h) Angaben zu einzelnen Versuchen:

zu S. 41: Verunreinigungen im Wachstumshormon-Präparat "Crescormon" (Angaben des Herstellers):

Prolactin: 0.05%, Neurophysin: 0.05%, LH: 0.03%, TSH: 0.003%, FSH: 0.001%, Vasopressin: 0.003%, ACTH: 0.10%; Die Bestimmung des ACTH-Gehalts des Hormonpräparats mit einem biologischen Test an isolierten Nebennierenzellen (121) ergab: 12.8ng/2mg "Cres-cormon" ($\frac{A}{A_0}$ 0.01%)

Zu Fig. 21, S. 43: Um 18^h erhielten Gruppen von normalen Ratten (110 - 150 g Körpergewicht) intraperitoneale Injektionen von:

- a) 0.75 i.u. kristallines Insulin (Fluka, Schweiz) gelöst in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung, pro 100g Körpergewicht oder
- b) 150µg Glukagon/100g Körpergewicht (Novo, Dänemark), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (150µg/ml), oder
- c) physiologische Kochsalzlösung. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten nach Injektion getötet.

Zu Tabelle 6, S. 48: 5 - 6 g schwere Lebern von 20 normalen Ratten (Zeitpunkt des Tötens 18^h, Körpergewicht 120 g) wurden im 1.8-fachen Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung homogenisiert. Die 10⁴g-Überstände der Homogenate wurden vereinigt und bis zur Präinkubation bei 0-4^o gelagert. Die Inkubationsmischung

enthielt 1.2ml Homogenisationspuffer (68; 10-fache Konzentration), 30 μ l 4 M Mercaptoäthanol und in wechselnden Kombinationen 30 μ l 2 M $MgCl_2$, 0.30ml 0.4M ATP, pH 7.2, 0.76ml 0.267 M Phosphoenolpyruvat, neutralisiert, 60 μ l Pyruvatkinase (2 mg/ml), 0.12ml 1mM cyclo-AMP, 0.6ml $2 \cdot 10^{-2}$ M Theophyllin und 0.06ml 1M NaF. Das Volumen wurde mit H_2O so eingestellt, daß es nach Start durch Zugabe von 4ml 10^4 g-Überstand 12.0ml betrug. Die Proteinkonzentration des 10^4 g-Überstands war 46.6mg/ml. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37° wurden die Ansätze auf $0-4^\circ$ abgekühlt und zur Präparation der Mikrosomen in üblicher Weise weiterverarbeitet.

9. Zu Kap. IV (Untersuchungen über die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Hepatomazellen)

a) Herkunft der Zell-Linie:

Bezeichnung: ML-HTC, Nr. 1

erhalten von: E.B. Thompson (122); Aufschrift des Zellbehälters

14. 7. 72

Passage: N

b) Für die Zellkultur verwendete Lösungen

(1) Medium: DMEM

Man löst die abgepackte Menge Pulvermedium in 10 l aqua dest. und gibt 37 g $NaHCO_3$ zu. Nach Begasung des Mediums mit CO_2 (pH 7.2) wird die Lösung steril filtriert und in 1 l-Flaschen zu je 900 ml abgefüllt (Osmolalität beträgt 320 mOsmol)

(2) DMEM/10 % FCS

100ml FCS+900ml DMEM

(3) Puck's Medium D₁ (20x)

80g NaCl

4 g KCl

0.3 g KH_2PO_4

0.45 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

ad 500 ml mit H_2O auffüllen und lösen. In 25 ml Portionen autoklavieren.

(4) Puck's Medium D 1 (1x)

25 ml D 1(20x) mit H_2O auf 500ml verdünnen.

(5) Puck's Medium D 1 (1x), Phenolrot (100x)

25 ml D 1 (20x)

362 mg Phenolrot

mit H_2O auf 500 ml auffüllen und steril filtrieren

(6) Glucose/Sucrose-Lösung

20 g Dextrose- H_2O

400 g Sucrose

mit H_2O auf 1000 ml auffüllen und steril filtrieren.

(7) 0.5 % Trypsin-Stammlösung

0.5 g Trypsin in 99.5 ml D 1 (1x) lösen und steril filtrieren.

In ca. 5.2ml Portionen abfüllen.

0.005 % Trypsinlösung

0.5%ige Trypsin-Stammlösung 5 ml

D 1 (20x) 25 ml

Glucose-Sucrose-Lösung 25 ml

aqua dest., steril 444 ml

(8) D 1 (1x) Phenolrot(100x) 1 ml

In 100 ml Flaschen zu 60ml-Portionen abfüllen.

(9) Puck's D 1 (1x)/Glucose/Sucrose/Phenolrot

D 1 (20x) 25 ml

D 1 (1 x)/Phenolrot (100x) 1 ml

Glucose/Sucrose 25 ml

aqua dest., steril 449 ml

(10) 0.5 % Nigrosin

0.5 g Nigrosin in 99.5 ml Lsg. Nr. 9 lösen

(11) 1 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

100mg $CaCl_2 \cdot H_2O$ in 9.9ml H_2O lösen

(12) 40 % Glucose

4 g Glucose in 6 ml H_2O lösen

(13) Puck's Medium D_2 (1x)

D 1 (20x) 50 ml

1 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.6 ml

40 % Glucose 2.5 ml

mit H_2O auf 1000 ml auffüllen

(14) DMEM, 7.5 % DMSO

DMEM 92.5 ml

Dimethylsulfoxid (DMSO) 7.5 ml

steril filtrieren

(15) 1 N NaOH

4.0 g NaOH ad 100 ml mit H_2O auffüllen und autoklavieren.

c) Subkultivierung

Nach Entfernung des Kulturmediums werden die Zellen zunächst mit 5 ml 0.005 %iger neutraler Trypsinlösung gewaschen, die Waschflüssigkeit sofort wieder abgesaugt und anschließend mit Trypsin (5ml 0.005% Trypsinlösung) 15 Min. inkubiert (CO_2 - Inkubator, 37°C). Die Trypsinisierung wird durch Zugabe von 10 ml DMEM/10% FCS (eisgekühlt) beendet. Die vollständig abgelösten und dispergierten Zellen werden zentrifugiert (10 Min. bei 500g, 0°C ; Ausschwingrotor) und nach Absaugen der überstehenden Flüssigkeit in einem geeigneten Volumen DMEM/10% FCS (eisgekühlt) aufgenommen. Eine Mischung aus gleichen Aliquoten (0.5 ml) der dispersen Zellsuspension und Nigrosin (0.5%ig) wird zur Zellzählung (Hämozytometer, Mikroskop) verwendet. Tote (mit Nigrosin gefärbte) und lebende (nicht gefärbte) Zellen werden gezählt. Die Berechnung der Zahl der lebenden Zellen pro ml Zellsuspension erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\text{Zahl der lebenden Zellen pro n Zählkammern} \times 10^4 \times 2}{n} = \text{Zahl lebender Zellen}$$

wobei die Lebensfähigkeit = $\frac{\text{Gesamtzahl}}{\text{Gesamtzahl}} \times 100$ ist.

Nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspensionen mit DMEM/10% FCS werden die Zellen auf Platten oder in Kolben ausgesät. Kulturmedium: DMEM/10 % FCS; Kulturbedingungen: CO_2 -Inkubator, 37°C ; 90 % Luft, 10 % CO_2 , 100 % Luftfeuchtigkeit.

d) Einfrieren der Zellen

Hierzu werden die Zellen nach der Vorschrift "Subkultivierung" bis einschließlich Zentrifugationsschritt behandelt. Nach Absaugen des überstehenden Mediums werden die Zellen in 5 ml DMEM/7.5 % DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wird in verschraubbare Glasröhrchen überführt und im Einfriergerät mit konstanter Einfriergeschwindigkeit ($1^\circ\text{C}/\text{min.}$) eingefroren.

e) Ernte der Zellen für die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.

Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen mit 2x8ml Puck's Medium D 2 (0°C) von restlichem Medium (Protein) freigewaschen. Mit einem geeigneten Schaber (mit Teflonband umwickeltes Plastiklineal) werden die Zellen von der Unterlage abgeschabt und die

breiige Zellsuspension mit einer Pasteurpipette in kleinen Portionen in ein Homogenisationsgefäß (0.5 - 1.0 ml) überführt. Die restlichen Zellen werden durch Nachspülen mit 2 - 3 Tropfen Medium D_2 gesammelt und mit der obigen Zellsuspension vereinigt. Das Volumen der Zellsuspension soll 1.0ml nicht übersteigen, um hohe Enzymkonzentrationen zu erhalten. Die Präparation der Mikrosomen, die Inkubation und Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase Aktivität wurde nach der üblichen Weise ausgeführt (siehe S. 67). Wegen der geringen Menge an Ausgangsmaterial mußte jedoch im Halb-Mikromaßstab gearbeitet werden. Nach Homogenisieren der Zellsuspensionen (Homogenisator, Kontes Glass Co., 0.5ml) werden die Homogenate in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen (3.5ml, Fa. Hormuth und Vetter, Heidelberg) transferiert und 10 min bei 10^4g zentrifugiert ($4^\circ C$). Die 10^4g -Überstände werden mit einer Pasteurpipette quantitativ in kleine Spinco-Zentrifugenröhrchen ($3/16 \times 1 \frac{5}{8}$ Zoll, Beckmann) überführt und 1 h bei 105 000 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands (Pasteurpipette) wird der Mikrosomenniederschlag 2 mal mit Homogenisationspuffer (68) gewaschen und in 200 μ l Homogenisationspuffer resuspendiert (Glasstab). Die ultrabeschallte Mikrosomensuspension wird direkt für die Inkubation zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität verwendet.

f) Angabe zu Fig. 23, S.51:

Für die Hormon-Inkubation wurde kristallines Insulin (vom Schwein, The Lilly Res. Labs; Glukagongehalt: 0.002%) verwendet. Die Kulturen befanden sich in der (N+5)ten Passage.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

1) Wir entwickelten ein Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, das weniger Zeit benötigt, als die üblicherweise verwendeten.

[1 - ^{14}C] Mevalonat, das sich während der Inkubation zur Ermittlung der Enzymaktivität aus [5 - ^{14}C] HMG-CoA bildet, wird nach Umwandlung in das Lacton durch Anionenaustauscherchromatographie von [5 - ^{14}C] HMG getrennt.

Zur Ausbeutekorrektur wird [^3H] Mevalonat als radioaktiver Standard verwendet.

2) Einer Verschiebung der Hell-Dunkelphase um 12 h folgt die Phase des Reduktaserhythmus innerhalb von 7 Tagen. In Übereinstimmung mit dieser Resynchronisation verlagert sich auch die Tageszeit größter Futteraufnahme im selben Zeitraum um 12 h in die neue Dunkelperiode. Der Hell-Dunkel-Wechsel ist also Zeitgeber des Enzymrhythmus.

3) Der Enzymrhythmus bleibt bei Tieren erhalten, die im Dauerlicht oder Dauerdunkel gehalten oder die geblendet wurden. Der Hell-Dunkel-Wechsel scheidet somit als Ursache des Enzymrhythmus aus.

4) Der Enzymrhythmus bleibt in ganglionektomierten und adrenalektomierten Ratten bestehen. Als mögliche Regulatoren des Enzymrhythmus scheiden die Hormone der Nebenniere und der Epiphyse aus.

5) Hypophysektomie beseitigt den Tagesrhythmus der HMG-CoA-Reduktase.

6) Eine einzelne Dosis Trijodthyronin hob bei hypophysektomierten Ratten die Aktivität des Enzyms innerhalb 48 Stunden - nicht aber innerhalb 6 Stunden - auf die hohen Vergleichswerte scheinoperierter Tiere an.

7) 6 Stunden nach Insulin-Injektion in Alloxan-diabetischen Ratten ist die spezifische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase 5 mal höher als in den Kontrolltieren, die kein Insulin erhielten und vergleichbar mit der in normalen Tieren. Insulin-Injektion in normale Tiere erhöht die Enzymaktivität innerhalb etwa 1 Stunde. Der anfänglichen Stimulierung der Enzymaktivität durch Glukagon-Injektion folgte später eine Hemmung.

8) Insulin-Injektion in hypophysektomierte Ratten steigert die niedrige HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nicht.

- 9) Trijodthyronin-Injektion in partiell Alloxan-diabetische Ratten steigert die Enzymaktivität auf das 3.6-fache.
- 10) Die HMG-CoA-Reduktase ist wahrscheinlich ein interkonvertierbares Enzym.
- 11) Insulin steigert die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Kulturen von Hepatomazellen.
- 12) Die Beziehung zwischen Thyroidhormon und Insulin sowie die mögliche Bedeutung weiterer Faktoren für die Regulation der hepatischen Cholesterolsynthese werden diskutiert.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Lynen, F., Chem. Weekblad, 43 (1960) 581
- (2) Bloch, K., Angew. Chemie, 77 (1965) 944
- (3) Popjak, G. und Cornforth, J. W., Adv. Enzymol. 22 (1960) 281
- (4) Wagner, A.F. und Folkers, K., ibid. 23 (1961) 471
- (5) Gould, R.G. und Taylor, C.B., Fed. Proc. 9 (1950) 179
- (6) Tomkins, G.M., Sheppard, H. und Chaikoff, I.L., J. Biol. Chem. 201 (1953) 137
- (7) Tomkins, G.M. und Chaikoff, I.L., ibid., 196 (1952) 569
- (8) Van Bruggen, I.T., Hutchens, T.T., Claycomb, C.K., Cathey, W.I. und West, E.S., ibid., 196 (1952) 389
- (9) Mosbach, E.H., Abell, L.L. und Halpern, E., Circulation, 18 (1958) 486
- (10) Beher, W.T., Baker, G.D. und Anthony, W.L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 100 (1959) 3
- (11) Bloomfield, D.K., Proc. Soc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 50 (1963) 117
- (12) Huff, J.W., Gilfillan, J.L. und Hunt, V.M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 114 (1963) 352
- (13) Myant, N.B. und Eder, H.A., J. Lipid. Res., 2 (1961) 363
- (14) Swell, L., Trout, E.C.Jr., Field, H., Jr., und Treadwell, C.R., Science, 125 (1957) 1194
- (15) Bucher, N.L.R., Mc Garrahan, D., Gould, E. und Loud, A.V., J. Biol. Chem. 234 (1959) 262
- (16) Tomkins, G.M., Chaikoff, I.L. und Bennett, L.L., ibid., 199 (1952) 543
- (17) Nejad, N.S. und Chaikoff, I.L., Endocrinology, 75 (1964) 396
- (18) Perry, W.F. und Bowen, H.F., Am. J. Physiol. 184 (1956) 59
- (19) Gould, R.G., Kojala, V.B. und Swyryd, E.A., Radiat. Res. 41 (1970) 57
- (20) Fletcher, K. und Myant, N.B., J. Physiol. (London), 144 (1958) 361
- (21) Hsia, T.-C. und Wang, S.-C., Scientia Sinica, 14 (1965) 874
- (22) Wong, R.K.L. und Van Bruggen, J. T., J. Biol. Chem. 235 (1960) 573
- (23) Wieland, O. und Eger-Neufeldt, I., Biochem.Z. 337 (1963) 349

- (24) Clarenburg, R. und Chaikoff, I.L., Am.J.Physiol. 210
(1966) 37
- (25) Williams, W.R., Hill, R. und Chaikoff, I.L., J. Lipid.Res.
1 (1960) 236
- (26) Berthet, J., Rad. Sci. Res., 3 (1958) 179
- (27) Bricker, L.A. und Levey, G.S., J. Biol. Chem. 247 (1972)
4914
- (28) Bucher, N.L.R., Overath, P. und Lynen, F., Biochem. Biophys.
Acta, 40 (1960) 491
- (29) Siperstein, M.D. und Fagan, V.M., J. Biol. Chem. 241 (1966)
602
- (30) Hamprecht, B., Nüssler, C., Waltinger, G. und Lynen, F.,
Eur. J. Biochem., 18 (1970) 10
- (31) Back, P., Hamprecht, B. und Lynen, F., Arch. Biochem.
Biophys. 133 (1969) 11
- (32) Guder, W., Dissertation (Univ. München 1966)
- (33) Guder, W., Nolte, I. und Wieland, O., Eur. J. Biochem.
4 (1968) 273
- (34) Hamprecht, B., Nüssler, C. und Lynen, F., FEBS Lett.
4 (1969) 117
- (35) Shapiro, D. und Rodwell, V., Biochem. Biophys. Res. Commun.
37 (1969) 867
- (36) Dugan, R.E., Slakey, L.L., Briedis, A.V. und Porter, J.W.,
Arch. Biochem. Biophys. 152 (1972) 21
- (37) Edwards, P.A., Muroya, H. und Gould, R.G., J. Lipid. Res.
13 (1972) 396
- (38) Wurtmann, R.J. und Axelrod, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,
57 (1967) 1594
- (39) Rapoport, M.J. und Feigin, R.D., Science, 153 (1966) 1642
- (40) Kandutsch, A.A. und Saucier, S.E., J. Biol. Chem. 244
(1969) 2299
- (41) Gregory, K.W., Smith, C.Z. und Booth, R., Biochem. J.
130, (1972) 1163
- (42) Siperstein, M.D. und Fagan, V.M., Adv. Enzyme Regul. 2 (1964)
249
- (43) Linn, T.C., J. Biol. Chem. 242 (1967) 990
- (44) Kawachi, T. und Rudney, H., Biochemistry, 9 (1970) 1700
- (45) Shapiro, D.J. und Rodwell, V.W., J. Biol. Chem. 246 (1971)
3210

- (46) Heller, R.A. und Gould, R.G., Biochem. Biophys. Res. Commun. 50 (1973) 859
- (47) Brown, M.S., Dana, S., Dietschy, J.M. und Siperstein, M.D., J. Biol. Chem. 248 (1973) 4731.
- (48) Higgins, M. und Rudney, R. Nature New Biol. 246 (1973) 60
- (49) Brown, M.S., Dana, S.E. und Goldstein, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70 (1973) 2162
- (50) Ritter, M.C. und Dempsey, M.E. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 (1970) 921
- (51) Ritter, M.C. und Dempsey, M.E. J. Biol. Chem. 246 (1971) 1536
- (52) Scallen, T.J., Schuster, M.E. und Dahr, A.K. J. Biol. Chem. 246 (1971) 224.
- (53) Kan, K.W., Ritter, M.C., Ungar, F. und Dempsey, M.E. Biochem. Res. Commun. 48 (1972) 423.
- (54) Fignognari, G.M. und Rodwell, V.W., Science, 147 (1965) 1038
- (55) Hamprecht, B., Dissertation (Univ. München 1968)
- (56) Hamprecht, B., Roscher, R., Waltinger, G. und Nüssler, C. Eur. J. Biochem. 18 (1971) 15
- (57) Edwards, P.A. und Gould, R.G., J. Biol. Chem. 247 (1972) 1520
- (58) Berndt, J., Gaumert, R. und Löwel, M., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 1454
- (59) Higgins, M., Kawachi, T. und Rudney, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 (1971) 138
- (60) Klein, D.C. und Weller, J.L., Science, 169 (1970) 1093
- (61) Black, B.I. und Axelrod, J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61 (1968) 1287
- (62) Aschoff, J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25 (1960) 11
- (63) Simpson, S. und Galbraith, J.J. Trans. Roy. Soc. Edinburgh 45 (1908) 65
- (64) Holmgren, H.J. und Swensson, A., Acta Med. Scand. (Suppl.) 278 (1953) 71
- (65) Halberg, F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25 (1960) 289
- (66) Zigmond, M., Shoemaker, W., Larin, F. und Wurtmann, R., J. Nutrition, 98 (1969) 71
- (67) Knappe, J., Ringelmann, E. und Lynen, F., Biochem. Z. 332 (1959) 332

- (68) Regen, D., Riepertinger, C., Hamprecht, B. und Lynen, F.,
ibid. 346 (1966) 78
- (69) Siperstein, M.D., Fagan, V.M. und Dietschy, J.M. J. Biol.
Chem. 241 (1966) 597
- (70) Guchhait, R.B. und Porter, J.W., Anal. Biochem. 15 (1966)
509
- (71) Linn, T.C., J. Biol. Chem. 242 (1967) 984
- (72) Hamprecht, B. und Lynen, F., Eur. J. Biochem. 14 (1970) 323
- (73) Shapiro, D.J., Inblum, R.L. und Rodwell, V.W., Anal. Biochem.
31 (1969) 383.
- (74) Goldfarb, S. und Pitot, H.C., J. Lipid. Res. 12 (1971) 512
- (75) Shefer, S., Hauser, S., Lapar, V. und Mosbach, E.H., J. Lipid
Res. 13 (1972) 402
- (76) Berndt, J. und Gaumert, R., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
351 (1970) 1297
- (77) Berndt, J. und Gaumert, R. ibid. 352 (1971) 345.
- (78) Hulcher, F.H. und Oleson, W.H., J. Lipid. Res. 14 (1973) 625
- (79) Aschoff, J. in: Weihe, W.H., Beiheft zur Int. Z. Vitaminf. 9
(1966) 43
- (80) Quay, W.B., Gen. Comp. Endocr. 3 (1963) 473
- (81) Wurtmann, R.J., Axelrod, J. und Kelly, D.E., The Pineal.
Acad. Press, New York London (1968)
- (82) Retiene, K., Zimmermann, E., Schindler, W. und Lipscomb, H.S.
13. Symp. Dtsch. Ges. Endokr. (1967) 318.
- (83) Kaul, L. und Berdanier, C.D., Fed. Proc. 31 (1972) A 669
- (84) Machado, C. R.S., Machado, A.B.M. und Wragg, L.E., ibid.
85 (1969) 846.
- (85) Snyder, S.H., Zweig, H., Axelrod, J. und Fischer, J.C.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 53 (1965) 301
- (86) Edwards, P.A., J. Biol. Chem. 218 (1973) 2912
- (87) Glick, D., Ferguson, R.B., Greenberg, L.J. und Halberg, F.,
Am. J. Physiol. 200 (1961) 811.
- (88) Critschlow, V., Liebelt, R.A., Bar-Sela, M. Mountcastle, W.
und Lipscomb, H.S., Am. J. Physiol. 205 (1963) 807
- (89) Halberg, F., Galicich, J.H., Ungar, F. und French, L.S.,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118 (1965) 414.
- (90) Scriba, P.C., Gerb, A.G., Kluge, F., Boss, N. und Müller,
O.-A., Z. Anal. Chem. 252 (1970) 284.
- (91) Müller, O.-A. und Scriba, P.C. unveröffentl. Versuche.

- (92) Glick, D., v. Redlich, D. und Levine, S. *Endocrinology*, 74 (1964) 653
- (93) Guillemin, R., Clayton, G.W., Smith, J.D. und Lipscomb, H.S. *ibid.* 63 (1958) 349
- (94) Guillemin, R., Clayton, G.W., Lipscomb, H.S. und Smith, J.D., *J. Lab. Clin. Med.* 53 (1959) 830
- (95) Scriba, P.C. und Müller, O.-A., in *Methoden der Hormonbestimmung* (Breuer, H. und Krüskemper, H.L., Hrsg.) Thieme Verlag, Stuttgart
- (96) Zimmermann, E. und Critchlow, V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 125 (1967) 658
- (97) Dunn, J., Scheving, L. und Millet, P., *Am. J. Physiol.* 223 (1972) 402
- (98) Hickmann, P.E., Horton, B.J. und Sabine, J.R., *J. Lipid. Res.* 13 (1972) 17
- (99) Nepokroeff, C.M., Lashmanan, M.R., Ness, G.C., Dugan, R.E. und Porter, J.W., *Arch. Biochem. Biophys.* 160 (1974) 387
- (100) Levey, H.A., Cheever, E. und Roberts, S., *Endocrinology* 59 (1956) 420
- (101) White, L.W., *Circulation*, 46 (1972) 253
- (102) Lakshmanan, M.R., Nepokroeff, C.M., Ness, G.C., Dugan, R. E. und Porter, J.W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 50 (1973)
- (103) Beg, Z.H., Allmann, D.W. und Gibson, D.M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54 (1973) 1362
- (104) Watson, J.A., *Fed. Proc.* 1455 A (1973) 480
- (105) Meites, J. und Kragt, C.L. in *Physiology and Biophysics*, Vol. III (Ruch, T.C. und Patton, H.D., eds. (1973) S. 186, W.B. Saunders Co., London
- (106) Rall, T.W. und Sutherland, E.W., *J. Biol. Chem.* 232 (1958) 1065
- (107) Samols, E., Tyler, J.M. und Marks, V. (1972) in *Glukagon, Mol. Physiol. Clin. and Therapeut. Implications.* (Lefebvre, P.J. und Unger, R.H. eds.) S. 151
- (108) Katalata, G.B., *Science* 182 (1973) 149
- (109) Shimazu, T. und Amakawa, A., *Biochim. Biophys. Acta.* 165 (1968) 335
- (110) Euler, U.S.v., *J. Physiol.* 105 (1946) 38

- (111) Robison, G.A., Butcher, R.W. und Sutherland, E.W.
Cyclic AMP, Academic Press, N.Y. (1971)
- (112) George, W.J., Polson, J.B., O'Toole, A.G. und Goldberg,
N. D. Proc. Natl. Acad. Sci. 66 (1970) 398
- (113) Knappe, I., Schlegel, H.-G. und Lynen, F., Biochem. Z.
335 (1961) 101
- (114) Buckel, W. und Eggerer, H., Biochem. Z. 343 (1965) 29
- (115) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. und David, M.M., J. Biol.
Chem. 177 (1949) 751
- (116) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall,
R.J., J. Biol. Chem. 193 (1951) 265
- (117) Hamprecht, B., unveröffentlichte Ergebnisse
- (118) Fiske, V.M., Science, 146 (1964) 253
- (119) Larrabee, M.G., Horowicz, P., Stekiel, W. und Dolivo, M.
in Metabolism of the nervous system (Richter, D. ed.),
Pergamon Press, London, 1959 S. 36
- (120) Weiser, H., in Beiheft zur Int. Z. Vitaminforsch. Bd. 9
(Weihe, W.H., Hrsg.) (1964) S. 126
- (121) Müller, O.-A., persönliche Mitteilung
- (122) Thompson, E.B., Curran, J. und Tomkins, G.W., Proc. Natl.
Acad. Sci. 56 (1966) 296
- (123) Huber, J., Latzin, S. und Hamprecht, B., Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 1645
- (124) Huber, J. und Hamprecht, B., ibid. 353 (1972) 307
- (125) Huber, J., Latzin, S., Langguth, O., Brauser, B. und
Hamprecht, B., FEBS Lett. 31 (1973) 261
- (126) Huber, J., Hamprecht, B., Müller, O.-A. und Guder, W.
ibid. 353 (1972) 313
- (127) Huber, J., Guder, W., Latzin, S. und Hamprecht, B.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 795

Lebenslauf

2. Februar 1945 : geboren in Augsburg-Göggingen
als Sohn des Zahnarzts Alfred Huber
und seiner Ehefrau Wilhelmine
geb. Gschwilm
- von September 1951 : Besuch der Volksschule in Grassau/
bis Juli 1955 Chiemgau
- von 1. September 1956 : Besuch der Ludwig-Thoma-Oberrealschule
bis 22. Juli 1964 Prien/Chiemsee
- Juni 1964 : Abschluß der Reifeprüfung
- von September 1964 : Militärdienst in Freyung/Bay. Wald beim
bis September 1966 Gebirgsjäger-Bataillon als Sanitäter.
- November 1966 : Beginn des Studiums der Biologie
an der Ludwig-Maximilian-Universität
München
29. Juli 1968 : Abschluß der Diplomvorprüfung
- von November 1969 : Ausführung vorliegender Diplom- und
bis Februar 1974 Doktorarbeit unter der Anleitung von
Dr. B. Hamprecht am Max-Planck-Institut
für Zellchemie und am Max-Planck-
Institut für Biochemie
(Leitung Professor F. Lynen)
- Juli 1970 : Tod meiner Mutter
- Juli 1971 : Abschluß der Diplomhauptprüfung in
Biologie
- November 1972 : Eheschließung mit Christiane Meynen
- November 1973 : Geburt meiner Tochter

